Untersuchungen zur Genetik der gruppenspezifischen Komponente (Gc)

Wilhelm Jenssen

1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545804_0047

Untersuchungen zur Genetik der gruppenspezifischen Komponente (Gc)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wilhelm Jenssen

aus Rehna / Mecklenburg

München 1962

A. Schubert, München 5, Cornelliusstr. 21 · Tel. 22 17 77

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. K. SALLER
Priv. Doz. Dr. Dr. F. SCHWARZFISCHER

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 1962

INHALTSANGABE

	Seite
EINLEITUNG	5
DEFINITION DER GRUPPENSPEZIFISCHEN KOMPONENTE	6
BESTIMMUNGSTECKNIK	6
PRINZIP DER IMMUNOELEKTROPHORESE	9
EIGENE BESTIMMUNGSTECHNIK	10
Apparative Anordnung	10
Chemikalien, Puffer, Antiseren	10
Pufferlösungen	11
Herstellung der Gelplatten auf den Objektträgern	11
Einfüllen des Blutserums	13
Elektrophorese	15
Einfüllen des Antiserums	16
Entwicklung der Präzipitate	17
Dokumentation	17
DIFFERENTIALDIAGNOSE	18
Präzipitate im Bereich des α_2-Globulins	18
Möglichkeiten zur Unterscheidung von Gc- und Hp-System	19
Eigene Methode der Diagnose	19
Kontrollseren	20
Anti-Gc-Serumfraktion	20
Diagnosetechnik	20
EXPERIMENTELLER TEIL	21
Giessen der Platten	21
Form und Anordnung der Stanzen	21
Testreihen gegen verschiedene Teil-Antihumanseren	24
Elektrophoretische Anordnung	25
Versuche zur Dokumentation	28
UNTERSUCHUNGSGUT	31
ERGEBNISSE	32
Phänotypen und Allelenhäufigkeit	32
Zur Populationsgenetik des Gc-Systems	36
Familienuntersuchungen	36
Zwillingsuntersuchungen	39
Mutter-Kind-Verbindungen	40
Korrelationen	42
Das Gc-System im männlichen und weiblichen Geschlecht	46

Seite

DISKUSSION 47

ZUSAMMENFASSUNG 48

LITERATURVERZEICHNIS 51

EINLEITUNG

Noch bis vor wenigen Jahren beschränkte sich das Interesse der Anthropologen und Humangenetiker hinsichtlich der Serumproteine auf die Studien, die MOLLISON mit Hilfe der Präzipitatreaktion (UHLENHUTH, NUTTAL) über die Verwandtschaftsbeziehungen im System der Primaten durchführte. Die rasch aufeinanderfolgenden Entdeckungen genetisch gesteuerter Polymorphismen verschiedener Serumproteine des Menschen haben das Gebiet der Proteingenetik nunmehr auch für die Humangenetik zugänglich gemacht.

Folgende Polymorphismen von Serumproteinen sind bisher bekannt:

TABELLE 1
(nach HARRIS 1961)

Protein	Varianten	Diagnostische Methode
Albumin	Analbuminämie	Elektrophorese
	Doppel-Albumin	Elektrophorese
Fibrinogen	Afibrinogenämie	Elektrophorese
Haptoglobin	Verschiedene Phänotypen: 1-1, 2-1, 2-2, 2-1 mod., O, etc.	Stärke-Gel-Elektrophorese
Transferrin	C, B_0, B_1, B_2, D_0, D_1, D_2, D_3, D_4	Stärke-Gel-Elektrophorese
α-Globulin	Agammaglobulinämie	Elektrophorese
	Gm-Typen: Gm(a+), Gm(a-), Gm-(b+), etc.	Serologisch
Coeruloplasmin	Fehlen bei Wilson'scher Krankheit	Immunchemisch und Spektrophotometrisch
Alkalische Phosphatase	Fehlen bei Hypophosphatasie	Enzymatisch
Serum-Cholinesterase	Atypische Form von Enzymen	Enzymatisch
? Albumin	Neue "albuminähnliche" Komponente im Serum einzelner miteinander verwandter Personen	Zwei-dimensionale Papier- u. Stärke-Gel-Elektrophorese
ß-Lipoprotein	Vollständiges oder teilweises Fehlen	Elektrophorese und Ultrazentrifuge
α_2-Komponente	Drei Phänotypen: Gc 1-1, Gc 2-2, Gc 2-1	Immunoelektrophorese
Koagulationsfaktoren	Fehlen von Antihämophylie-Globulin, Christmas-Faktor, Faktor V, etc.	Koagulationsteste

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der von HIRSCHFELD 1959 entdeckten sogenannten gruppenspezifischen Komponente, dem Gc-System, das in der vorste-

henden Tabelle als α_2-Komponente geführt ist. Über die Genetik dieses Systems liegen bisher noch sehr wenige Untersuchungen vor; publiziert sind nur Ergebnisse von HIRSCHFELD und Mitarbeitern sowie von CLEVE und BEARN.

Eine eigene gemeinsam mit BAITSCH durchgeführte Untersuchung befasste sich zunächst mit der Verteilung der drei Phänotypen in einer Gruppe bayerischer Blutspender; aus diesen Phänotypenhäufigkeiten wurden die Genfrequenzen geschätzt.

Das Ziel dieser hier vorgelegten Untersuchung war es, eine von technischen Schwächen freie Routinemethode zur Bestimmung des Gc-Systems zu entwickeln. Mit dieser Methode sollten dann Familienuntersuchungen und Untersuchungen an Mutter-Kind-Verbindungen durchgeführt werden zur Prüfung der Hypothese des autosomalen 2-Allelen-Erbganges mit Codominanz der beiden Allele. (Hypothese von HIRSCHFELD und Mitarbeitern)

DEFINITION DER GRUPPENSPEZIFISCHEN KOMPONENTE

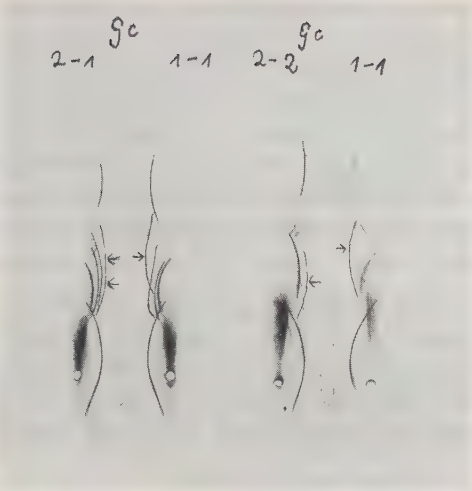
Die von HIRSCHFELD sogenannte "gruppenspezifische Komponente" ist ein Serumprotein, das zu der Gruppe der α_2-Fraktion gehört. Über seine chemischen und physikalischen Eigenschaften ist bisher nur sehr wenig bekannt. Sicher scheint zu sein, dass es kein Mucoproteid ist. Die grosse Diffusionsgeschwindigkeit im Agar-Gel spricht dafür, dass die Molekülgrösse nicht sehr bedeutend ist. In der Ultrazentrifuge hat die Fraktion, zu der dieses Protein gehört, eine Sedimentationskonstante von 4 S (CLEVE und BEARN).

Der Polymorphismus des Gc-Systems äussert sich darin, dass dieses Protein bei individueller Konstanz in drei unterschiedlichen Formen auftreten kann. Diese drei Typen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Mobilität; bei geeigneter Technik können diese Mobilitätsunterschiede sichtbar gemacht werden (Vergleiche weiter unten zur Bestimmungstechnik sowie zur Identifizierung der drei Typen).

BESTIMMUNGSTECHNIK

Die von HIRSCHFELD ursprünglich angewendete und auch heute als einzig verlässlich geltende Methode zur Bestimmung der Gc-Faktoren ist die Immunoelektrophorese, wie sie erstmals von GABAR und WILLIAMS beschrieben wurde. Auch HIRSCHFELD verwendet die jetzt allgemein übliche Mikromodifikation von SCHEIDEGGER (1955). Bei Anwendung dieser Methode sind die drei Typen, in der die gruppenspezifische Komponente auftritt, wie folgt zu identifizieren:

1. Bei einem Teil der Präzipitatbilder wie sie HIRSCHFELD in der von ihm untersuchten schwedischen Durchschnittsbevölkerung fand, zeigte sich zwischen dem



A B C D

ABBILDUNG 1a

Die 3 Gc-Typen; A Gc 2-1,
B, D Gc 1-1,
C Gc 2-2-

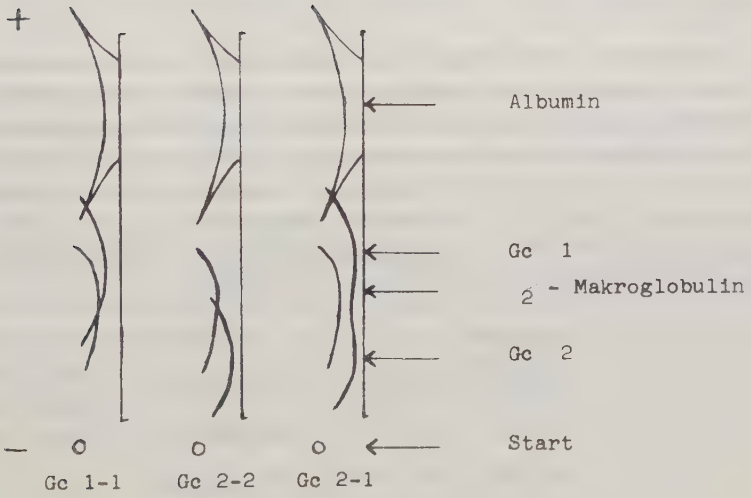


ABBILDUNG 1b

Schematische Darstellung der 3 Gc-Phänotypen

Albumin und dem α_2-Makroglobulin ein gleichmässig gekrümmter Präzipitatbogen, der sich durch seine Lage (bedingt durch eine grosse Diffusionsgeschwindigkeit im Agar-Gel) gegenüber den übrigen Fraktionen deutlich abhebt; dieser Präzipitatbogen ist charakteristisch für eine schnell anodisch gewanderte Fraktion. Die gleichmässige Krümmung des Bogens deutet darauf hin, dass diese Fraktion nur ein Diffusionszentrum hat, was auf Homogenität der betreffenden Proteinfraktion hinweist. HIRSCHFELD bezeichnet diesen Typus als Gc 1-1 (Abb. 1). Die Häufigkeit dieses Typus in dem von HIRSCHFELD untersuchten Materials ist 55,73 %.

2. An Stelle dieser schnell gewanderten Fraktion tritt bei rund 7 % der untersuchten Seren eine deutlich langsamer gewanderte Fraktion auf; der Präzipitatbogen ist auch hier wieder gleichmässig gekrümmt, er deutet wieder auf ein Diffusionszentrum hin und dementsprechend auf Homogenität der zugrunde liegenden Proteinfraktion. HIRSCHFELD bezeichnet diesen Typus als Gc 2-2.

3. Bei einer relativ grösseren Gruppe von Seren fehlen diese beiden genannten gleichförmig gekrümmten Präzipitatbögen; an ihrer Stelle findet sich ein langgestrecktes Präzipitat, das sich über die Bereiche der Typen Gc 1-1 und Gc 2-2 erstreckt. Dieser lange Präzipitatbogen lässt bei genügend starker Streckung des Proteinbandes zwei Maxima (zwei Diffusionszentren) erkennen. Diese zwei Diffussionszentren sind dahingehend zu interpretieren, dass die zugrunde liegende Fraktion nicht homogen ist; sie setzt sich sehr wahrscheinlich aus zwei hintereinander liegenden, einer schneller wandernden und einer langsamer wandernden Fraktion zusammen. HIRSCHFELD bezeichnet diesen Typus als Gc 2-1; die Häufigkeit dieses Typus ist im Materials von HIRSCHFELD 37,21 %.

Die Proportion der Häufigkeit in der diese drei Typen auftreten, deutet darauf hin, dass es sich um die drei Phänotypen eines 2-Allelen-Systems handelt. Nach HIRSCHFELD, JONSSON und RASMUSON werden die drei Phänotypen Gc 1-1, Gc 2-1 und Gc 2-2 bedingt durch ein Paar autosomaler alleler Gene, Gc^1 und Gc^2. Der Typus Gc 1-1 ist danach der dem homozygoten Genotypus Gc^1/Gc^1 entsprechende Phänotypus; der Typus Gc 2-2 repräsentiert entsprechend die Homozygotie des Allels Gc^2 (Genotypus Gc^2/Gc^2), Der langgestreckte Typus Gc 2-1 wird bedingt durch Heterozygotie der beiden Allele Gc^1 und Gc^2. (Abb. 2)

Genotypus		Phänotypus
Gc^1/Gc^1	⟷	Gc 1-1
Gc^2/Gc^1	⟷	Gc 2-1
Gc^2/Gc^2	⟷	Gc 2-2

ABBILDUNG 2

Schema über die Beziehung zwischen Geno- und Phänotypus im Gc-System

PRINZIP DER IMMUNOELEKTROPHORESE

Die Immunoelektrophorese stellt die Koppelung zweier Untersuchungsmethoden dar: Die Elektrophorese ist ein physikalisch-chemisches Verfahren zur Trennung eines Proteingemisches; die Präzipitation im Agar-Gel ist eine immun-chemische Methode.

Die Elektrophorese im Agar-Gel hat durch WIEME eine sehr ausführliche Darstellung erfahren; auf diese Spezialliteratur sei verwiesen. Die von GRABAR und WILLIAMS entwickelte Kombination der Elektrophorese mit der Immunpräzipitation im Agar-Gel ist monographisch bearbeitet worden von GRABAR und BURTIN. Im deutschen Schrifttum haben vor allem der Arbeitskreis um SCHULTZE, SCHWICK (Behring-Werke AG.) und andere diese Methode mehrfach dargestellt. Die ausführliche Publikation der Mikromodifikation ist von SCHEIDEGGER vorgenommen worden. Für die Anthropologie wurde mit der Methode der Immunoelektrophorese erstmals von BAITSCH und STUMPF (1959) sowie offenbar auch von HIRSCHFELD und Mitarbeiter (Veröffentlichungen seit 1960) gearbeitet.

Die Durchführung der Immunoelektrophorese wird weiter unten geschildert werden.

Das Prinzip des Verfahrens ist folgendermassen zu charakterisieren:

In einem Gel aus Agar mit einer Pufferlösung werden mit Hilfe eines Gleichstromfeldes die Proteinfraktionen des Serums aufgetrennt. Nach durchgeführter Fraktionierung diffundieren die einzelnen Anteile des Serumproteingemisches gegen ein spezifisches Antiserum, das längs der elektrophoretischen Auftrennung eingebracht wird. An der Berührungsstelle der Proteine mit ihren spezifischen Antikörpern treten Immunpräzipitate auf, die sich im Agar-Gel als weisse, halbmondförmige Bögen darstellen. Form und Lage dieser Präzipitatbögen sind abhängig einmal von der Wanderungsgeschwindigkeit im elektronischen Feld (elektrophoretisches Prinzip), zum anderen von der Diffusionsgeschwindigkeit der Proteine, in Abhängigkeit ihrer Molekülgrösse und Form.

Die Immunoelektrophorese ist eine äusserst empfindliche Methode zum Nachweis auch sehr kleiner Proteinmengen. Während es mit der üblicherweise verwendeten Papier-Elektrophorese nur gelingt, einige wenige grobe Fraktionen im Blutserum zu differenzieren, können mit der Immunoelektrophorese unter guten experimentellen Bedingungen und vor allem bei Verwendung hochspezifischer Antiseren bis zu 25 verschiedene Komponenten unterschieden werden. Auf das beigegebene Diagramm (Abb.3) sei verwiesen.

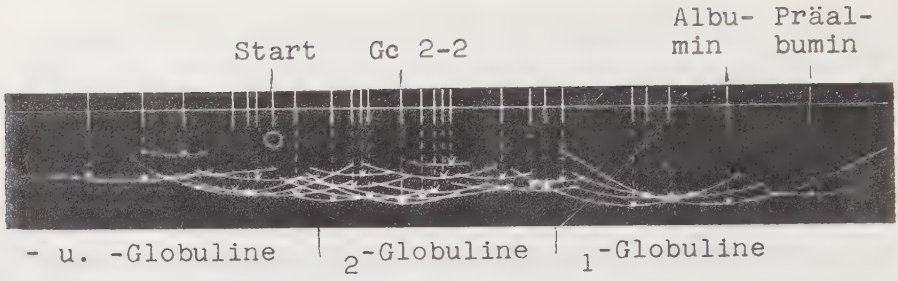


ABBILDUNG 3

Diagramm eines Normalserums vom Menschen des Typs Gc 2-2 nach der Immunoelektrophorese (nach HIRSCHFELD abgeändert)

EIGENE BESTIMMUNGSTECHNIK

Die ursprünglich von GRABAR und WILLIAMS angegebene Form der Immunoelektrophorese, wie sie dann von SCHEIDEGGER als Mikromodifikation eigeführt wurde, wurde auch von uns übernommen. Wir haben sie in mehreren Einzelheiten, vor allem hinsichtlich der apparativen Anordnung mehrfach modifiziert.

Apparative Anordnung

a) Pherograph Original Frankfurt n. WIELAND und PFLEIDERER, nach entsprechender Abänderung der Trennkammern (vergl. Abb. 7b), mit Kühlung.

b) Niederspannungselektrophorese ohne Kühlung unter Verwendung von Teilen des Pherographen Frankfurt (Puffertröge) und einem Stromzuführungsgerät mit kontinuierlich regelbarer Spannung und Stromstärke (Hersteller: Oberwerkmeister KAIBLINGER, Elektrophysikalisches Institut der Technischen Hochschule München).

Chemikalien, Puffer, Antiseren

a) Reinagar Behring-Werke zur Durchführung der Agar-Gel-Elektrophorese und der anschliessenden Geldiffusion und Präzipitation im Agar.

b) Difco Special Agar - Noble (Control-Nr. 451709).

Beide Agar-Sorten haben sich als brauchbar erwiesen; gewisse Vorzüge scheint der Difco Special Agar - Noble zu zeigen, da die Präzipitate in diesem Agar etwas schärfer herauskamen als im Behring-Werk-Reinagar, vor allem bei Verwendung der Antiseren vom Pferd (Pasteur-Institut). Die Verwendung beider Agar-Sorten erfolgt nach den Angaben HIRSCHFELDs in 1%iger Konzentration.

Puffersystem: Diskontinuierlicher Calciumlactat-Veronal-Puffer nach LAURELL, in der Modifikation von HIRSCHFELD, pH 8,6. (Zusammensetzung des Puffers und Zubereitung vergleiche weiter unten)

Immunseren:

a) Voll-Antihumanseren
   1. Op.Nr. 79, vom Kaninchen (Behring-Werke),
   2. Op.Nr. 130, vom Kaninchen (Behring-Werke),
   3. Op.Nr.13415, vom Pferd (Pasteur-Institut, Paris)

b) Antihumanserum-Fraktionen
   1. Anti-α_1-Globulinfraktion-Serum, Op.Nr. 86,
   2. Anti-α_2-Globulinfraktion-Serum, Op.Nr. 346/47,
   3. Anti-ß Globulinfraktion-Serum, Op.Nr. 349/50,
   4. Anti-Humanserum inkomplett, Op.Nr. 365,
   5. Anti-Gc-Faktorserum, Op.Nr.3421,
   6. Anti-Gc-Faktorserum, Op.Nr.3438,
   (1.-5. vom Kaninchen, 6. vom Pferd, alle Behring-Werke)

Pufferlösungen

a) Zusammensetzung des Brückenpuffers

Ca-lactat	:	1,92 g,
Na-Veronal	:	43,80 g,
Veronal	:	6,90 g,
Aqua dest.	:	ad 5,00 l.

b) Zusammensetzung der Stammlösung für den Agar-Gel-Puffer:

Ca-lactat	:	4,60 g,
Na-Veronal	:	31,53 g,
Veronal	:	4,98 g,
Aqua dest.	:	ad 3,00 l.

c) Zubereitung der Pufferlösungen:

Zunächst wird das in kaltem Wasser schwer lösliche Veronal in heissem Aqua dest. gelöst, etwas abkühlen lassen und dann mit dem im normal temperierten Aqua dest. gelösten Ca-lactat und Na-Veronal auf 5 l (bzw. 3 l) aufgefüllt, so dass die Endlösung normale Zimmertemperatur hat. Die Lösungen sollen möglichst erst nach 24 Stunden benutzt werden.

Herstellung der Gelplatten auf den Objektträgern

a) Arbeitsgerät:

Als Arbeitsplatz für die Herstellung der mit Agar-Gel beschichteten Objektträger (26 x 76 mm) benötigt man eine horizontal liegende Platte, die et-

wa 70 Objektträger in Abständen von 2 cm aufnehmen kann. Die Objektträger werden mit Chromschwefelsäure gereinigt und unter Alkohol aufbewahrt, kurz vor Gebrauch mit einem weichen Tuch sauber abgetrocknet, mit einem Glasschreiber signiert und gegen Verstauben abgedeckt.

Ausserdem werden benötigt:

5 Mess- oder Vollpipetten zu 2 ml,
2 Erlenmeyerkolben zu 250 ml,
1 Messzylinder, 10 ml,
1 " , 25 ml,
1 " , 50 ml,
1 " , 100 ml,
1 Wasserbad,
1 Stanze (Abb. 5),
1 Wasserstrahlpumpe und
mehrere Injektionsnadeln verschiedner Grösse.

b) Agar-Gel:

3 Raumteile eines 2 %igen Reinagars in Aqua dest. werden im Wasserbad erhitzt und geschmolzen (10 Min.); danach wird ein Gemisch von 2 Raumteilen der oben beschriebenen Stammlösung mit 1 Raumteil Aqua dest., das ebenfalls erwärmt wurde, dazugegeben, gut durchgeschüttelt und noch einige Zeit (3-5 Min.) im heissen Wasserbad belassen. Um Bakterienwachstum auf den Objektträgern zu vermeiden, kann man so viel Cialit (Hersteller: Asid-Institut GMBH, München) dazugeben, dass eine Endkonzentration von 1 : 10 000 erreicht wird. Der Verlust an Wasser, der während des Erwärmens entsteht, wird am Schluss durch Auffüllen mit Heissem Aqua dest. wieder ausgeglichen, so dass man ein 1 %iges Agar-Agar-Sol erhält. (Abb. 4)

Für die Immunoelektrophorese ist hochgereinigter Agar notwendig, den man sich selbst herstellen kann aus einem gewöhnlichen Agar (HIRSCHFELD, Science Tools, Vol. 7, No. 2, 18-25 (1960)). Zur Arbeitserleichterung wurde hochgereinigter Agar der Behring-Werke (Reinagar) sowie Difco Special Agar - Noble verwendet, die in flockiger, trockener Form im Handel sind. Die jeweils nötigen Mengen wurden stets erst unmittelbar vor Gebrauch den Flaschen entnommen.

c) Giessen der Platten:

Mit einer (im Brutschrank) vorgewärmten 2 ml-Pipette werden jeweils 2 ml flüssiger Agar auf die vorher gereinigten und signierten Objektträger gegeben. Durch die horizontale Unterlage ist gewährleistet, dass eine gleichmässige Verteilung der noch heissen Flüssigkeit erfolgt, die jedoch auf dem kalten Objektträger recht bald zu einem ca. 1 mm dicken Gel erstarrt. Um ein Eintrocknen des Gels zu vermeiden, muss eine feuchte Kammer um die gegossenen Gelplatten geschaffen werden. Die einfachste Möglichkeit ist, möglichst schnell

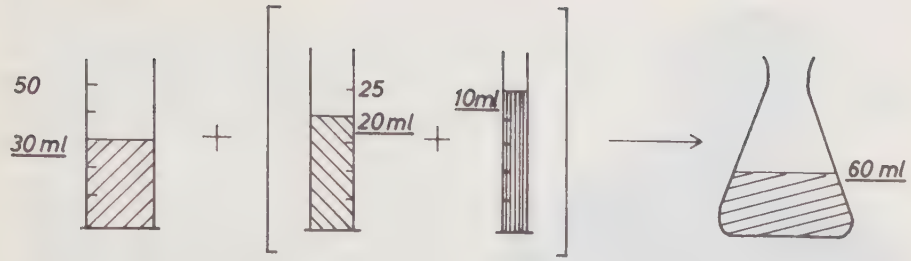


ABBILDUNG 4

Zusammensetzung von 60 ml Agar-Gel
(ausreichend für 28 Objektträger)

die Gelplatten zu giessen und jeweils 5-10 Objektträger mit einem flachen Deckel, der am Boden gut anliegt, zu bedecken, so dass sich die feuchte Kammer von selbst bilden kann.

d) Stanzen der Platten:

Nachdem das Gel erkaltet ist, werden auf jeder Gel-Platte mit einer Stanze (Abb.5a) ein Kanal und 2 Löcher mit folgenden Ausmassen vorgestanzt (Abb. 5b): (siehe S.14)

Um den weiteren Arbeitsgang zu vereinfachen und nicht jeden Objektträger einzeln in die Hand nehmen zu müssen, wurden für die Hochspannungselektrophorese kleine Rahmen (Abb.7b) angefertigt, die je 14 Objektträger aufnehmen können; für die Niederspannungselektrophorese wurden einfache Plexiglasplatten (25 x 30,5 x 0,4 cm) als Träger benutzt. Die Objektträger auf den Rahmen (bzw. Platten) werden wieder gegen Verdunstung abgedeckt.

Mit einer glatt geschliffenen Kanüle, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist, wird das Gel aus den vorgestanzten Löchern so entfernt, dass der Rand der Löcher nicht beschädigt wird. Später wurden, auf persönlichen Ratschlag Herrn Dr.HIRSCHFELDs hin, feine Pasteur-Pipetten verwendet.

Einfüllen des Blutserums

Die zu untersuchenden eingefrorenen Seren werden ca. 12 Stunden vor Gebrauch in einen Kühlschrank zum Auftauen gestellt und etwa 1 Stunde vor der Elektrophorese herausgenommen, so dass sie beim Einfüllen in die Löcher Zimmertem-

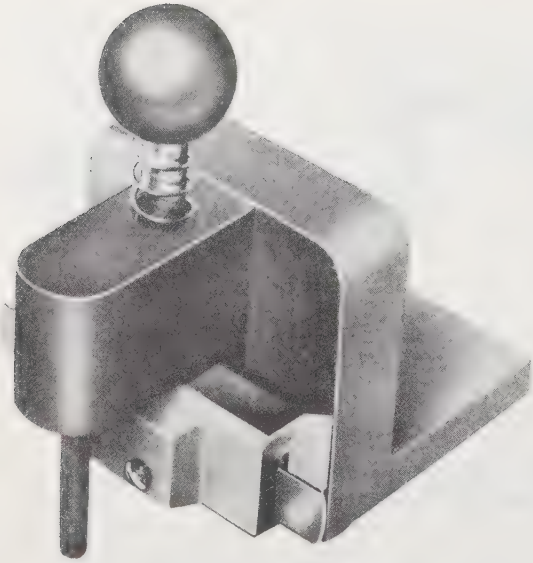


ABBILDUNG 5a

Stanze
(n. Laborblätter d. Behring-Werke,
8. Jahrg., Febr. 1958 H. 1, S. 14)

ABBILDUNG 5b

Stempel der Stanze
a = Kanal, 1,8 x 35 mm
b = Einfülloch, 1 8 mm ø

peratur haben. Vor dem Einfüllen der Seren ist es wichtig, diese gut durchzuschütteln, da sich auf Grund der verschiedenen spezifischen Gewichte die einzelnen Fraktionen beim Lagern stets etwas entmischen.

Das Einfüllen geschieht mit Pasteur-Pipetten. Durch die Kapillarwirkung ist ein Ansaugen des Serums mit dem Mund nicht nötig: Durch genügend tiefes Eintauchen der Pipette wird so viel Serum aufgenommen, dass es beim Eingeben in die Einfüllöcher wieder mühelos ausfliesst. Man muss darauf achten, dass die Löcher gleichmässig bis zum Rand mit Serum gefüllt sind.

Die selbstgefertigten Pasteur-Pipetten wurden jeweils nur einmal benützt.

Um auch beim Einfüllen der Seren ein Austrocknen des Gels zu vermeiden, wird eine feuchte Kammer mit 4 Glasplatten so abgedeckt, dass jeweils nur das eine Loch, in das Serum einzufüllen ist, freiliegt.

Unmittelbar nach dem Einfüllen werden die Seren elektrophoretisch aufgetrennt, damit sie nicht bereits am Einfüllpunkt zu weit in das Gel hineindiffundieren. Die Anordnung ist aus folgenden Skizzen zu entnehmen (Abb. 6, 7):

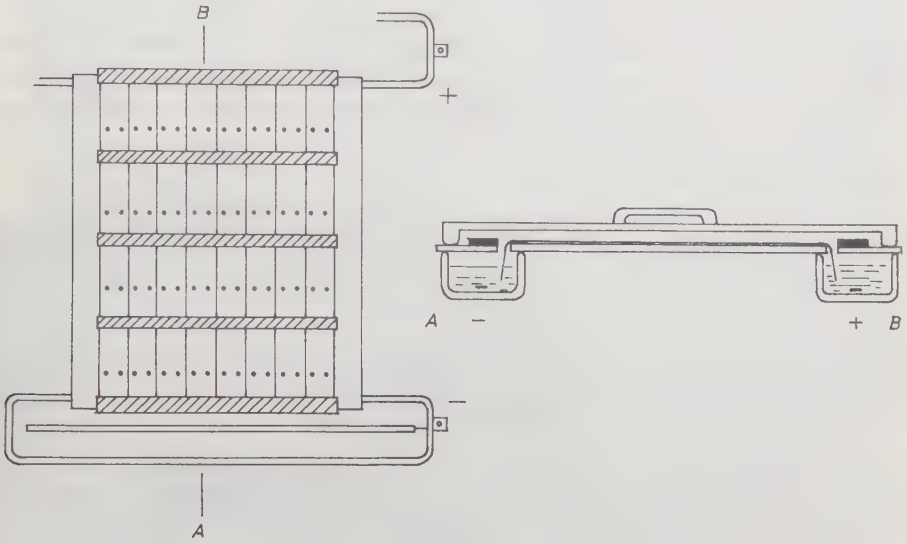


ABBILDUNG 6a

Schema der Anordnung bei der Niederspannungs-Elektrophorese
(Vergl. Abb. 12)

Bei der Elektrophorese tritt eine Erwärmung des Agar-Gels ein. Die dadurch verursachte Verdunstung des Aqua dest. aus dem Gel wird durch eine feuchte Kammer, die um die Objektträger herum gebildet wird, weitgehend verhindert (Abb. 6, 7).

Stromstärke und Spannung siehe weiter unten, experimenteller Teil.

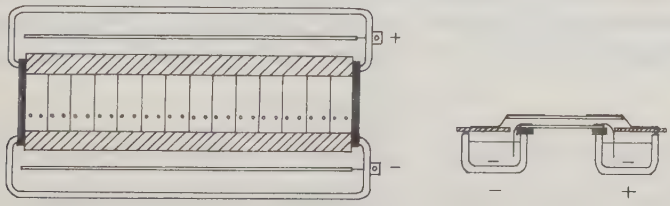


ABBILDUNG 6b

Schema der Anordnung bei der Hochspannungs-Elektrophorese
(Vergl. Abb. 12)

Einfüllen des Antiserums

Im Anschluss an die Elektrophorese werden sofort die vorgestanzten zentralen Kanäle, die parallel der elektrophoretischen Trennungsrichtung laufen, mit der leicht aufgebogenen Spitze einer grossen Kanüle (die an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen sein kann) ausgehoben. Zuvor wird die Anodenseite des Kanals angeschnitten und dann erst das Gel von der Kathodenseite her entfernt. (Bei der Hochspannungs-Elektrophorese tritt trotz der feuchten Kammer anodenwärts eine spürbare Verdunstung auf; hierdurch wird das Gel ein wenig dünner). Aus einer Pasteur-Pipette lässt man nun das Antiserum von der Kathodenseite her in den Kanal einfliessen, bis der Kanal gefüllt ist.

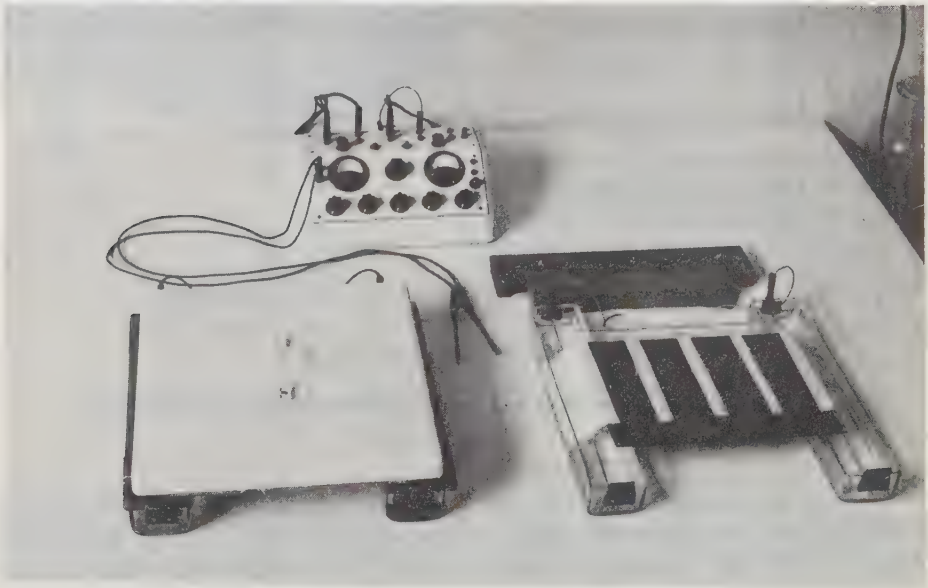


ABBILDUNG 7a

Niederspannungs-Elektrophorese
Rechts Anordnung der Apparatur, dahinter Schaumstoff u. PVC-Platten zur Herstellung der feuchten Kammer, wie sie links im Bild zu sehen ist. (vergl. Abb. 6a)

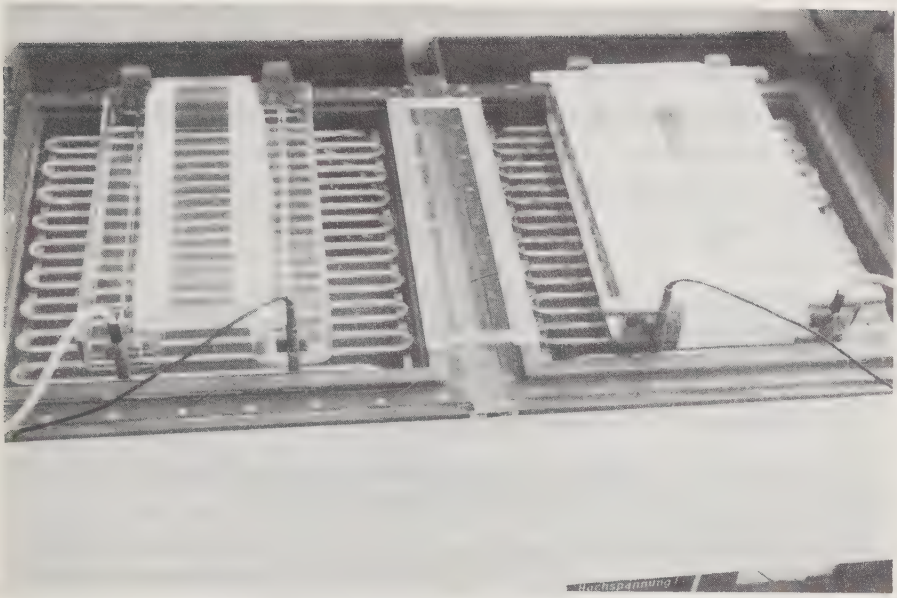


ABBILDUNG 7b

Hochspannungs-Elektrophorese
Links Anordnung der Apparatur, rechts feuchte Kammer (vergl. Abb. 6b), in der Mitte ein Tragrahmen.

Entwicklung der Präzipitate

Sobald alle Kanäle gefüllt sind, werden die Objektträger gleichzeitig auf der Platte oder dem Rahmen zur Entwicklung der Präzipitate in eine feuchte Kammer von 37°C gegeben. Am besten eignet sich dazu ein Brutschrank entsprechender Grösse, in den eine Schale mit warmem Wasser (37°C) gestellt wird.

Nach etwa 14 bis 16 Stunden kann man das Ergebnis der Immunreaktion erkennen und die Diagnose an dem noch feuchten Präparat ablesen (siehe weiter unten Differentialdiagnose)

Dokumentation

Zur Dokumentation werden die Präparate auf folgende Weise haltbar gemacht:

1. 2 mal Spülen und Wässern in physiologischer Kochsalzlösung, etwa 2 Tage lang. So werden die nicht präzipitierten Serum- und Antiserumproteine herausgelöst.
2. Trocknen der Präparate ca. 3 Tage bei Zimmertemperatur. Um ein Auskristal-

lisieren der Puffersalze zu verhindern, werden die Präparate mit einem in Aqua dest. getränktem, glatten Filterpapier abgedeckt.

3. Nach dem Trocknen lässt sich das Filterpapier ohne Schwierigkeit ablösen. Nur 2 mal musste es kurz (5-10 Min.) in Aqua dest. eingeweicht werden, ehe es sich löste. Die Präparate wurden dann sofort abgetrocknet ohne Schaden zu erleiden.

4. Färben:
   a) Einweichen in 2 %iger Eisessiglösung: 5 Minuten,
   b) Färben in einer gesättigten Lösung von Amidoschwarz in Methanol-Eisessig (9 +1) : 60 Minuten,
   c) Entfärben I : Methanol-Eisessig (9 +1) : 15 Minuten,
   d) Entfärben II: Methanol-Eisessig (9 +1) : 15 Minuten.

Bei trockener Lagerung in Präparatekästen haben die Präparate, die z.T. schon über 1 Jahr lagern, keinerlei Veränderung erfahren.

DIFFERENTIALDIAGNOSE

Präzipitate im Bereich des α_2-Globulins

Bei der Differentialdiagnose an Hand der immunoelektrophoretischen Bilder, die mit einem kompletten Antihumanserum erhalten wurden, ist es wichtig, die einzelnen Präzipitate, die im α_2-Bereich auftreten, genau zu kennen. Ausser dem Gc-System liegen in diesem Bereich

1. das α_2-Lipoprotein,
2. das α_2-Makroglobulin,
3. das α_2-Coeruloplasmin sowie
4. die verschiedenen Präzipitate des Hp-Systems.

Die Präzipitate von 1. und 3. stören nicht, da sie auf Grund einer relativ geringen Diffusionsgeschwindigkeit der Antigene verhältnismässig weit vom zentralen Kanal entfernt liegen. Das Präzipitat des anodisch meist etwas hakenförmig aufgebogenen α_2-Makroglobulins liegt zwischen diesen beiden Bögen und dient als Anhaltspunkt für die Laufweite. Als störend könnten nur die verschiedenen möglichen Präzipitatbilder des ebenfalls polymorphen Hp-Systems angesehen werden. Es tritt, wie das Gc-System, in drei diesem ähnlichen Phänotypen auf : Hp 1-1 als schnell wandernde und Hp 2-2 als langsam wandernde homogene Komponente und Hp 2-1 als heterogene Komponente, die sich über die Bereiche der erstgenannten erstreckt.

Möglichkeiten zur Unterscheidung von Gc- und Hp-System

Verschiedene Möglichkeiten erlauben es, diese Präzipitate voneinander zu unterscheiden:

1. Die Haptoglobine können Haemoglobin binden und transportieren und durch Benzidin-Färbung kenntlich gemacht werden, während im Gc-System diese Fähigkeit nicht vorhanden ist.

2. Fügt man einem Serum Haemoglobin zu, so ändern die Haptoglobine ihre elektrophoretische Eigenschaft, indem sie als Hp-Hb-Komplex nicht mehr so weit anodenwärts wandern wie freies Haptoglobin. Die elektrophoretische Position der Gc-Faktoren bleibt auch bei Hinzufügen von Haemoglobin unverändert (HIRSCHFELD).

3. Auf Grund ihrer etwas grösseren Diffusionsgeschwindigkeit im Agar-Gel befinden sich die Präzipitate des Gc-Systems etwas näher am zentralen Kanal als die Hp-Präzipitate, so dass sie an dieser morphologischen Eigentümlichkeit erkannt werden können.

4. Mit absorbierenden Agenzien (Albumin 70 mg/ml + Properdin 1,7 mg/ml) kann man die Bildung von Hp-Präzipitaten verhindern, so dass im fraglichen Bereich nur die Phänotypen des Gc-Systems erscheinen (HIRSCHFELD).

5. Die verschiedenen Gc-Komponenten besitzen -ebenso wie die Hp-Komponenten- unterschiedliche elektrophoretische Eigenschaften, sind aber wie letztere immunologisch identisch (HIRSCHFELD). Deshalb ist es möglich, diese Proteine mit speziellen fraktionierten Antihumanseren unabhängig voneinander zu entwickeln.

Um eine für das Gc-System geeignete Fraktion zu erhalten, wurden verschiedene, von den Behring-Werken, Marburg/Lahn, zur Verfügung gestellte Antihumanserum-Fraktionen getestet. (**Siehe weiter** unten Abb. 10 und 11, experimenteller Teil)

Eigene Methoden der Diagnose

Für die Differentialdiagnose wurden im allgemeinen die Methoden 1+3 kombiniert.

Die Hp-Bestimmung gemäss 1. wurde im Rahmen der Routine-Untersuchungen des Instituts durch unabhängige Doppeldiagnose vorgenommen, so dass für jedes Serum der Hp-Typus bekannt war. Die einzelnen Gc-Phänotypen wurden auf folgende Weise identifiziert:

Das Diffusionszentrum von Gc 1-1 (der im Präzipitatbogen dem Kanal nächste Punkt) liegt stets anodisch vom Diffusionszentrum des α_2-Makroglobulins (Abb. 1)

während der dem Kanal nächste Punkt des Gc 2-2 Präzipitats nur wenig kathodenwärts liegt (Abb. 1). Bei Gc 2-1 findet man einen flach gestreckten Bogen über diese beiden Bereiche, sehr oft sogar eine doppelte Krümmung (Abb. 1).

Kontrollseren

Um eine ständige Kontrolle über die Brauchbarkeit der angewandten Antihumanseren zu haben, wurden 20 Seren von Blutspendern hinsichtlich des Gc-Faktors mehrere Male unabhängig voneinander geprüft und ausserdem dankenswerterweise von Herrn Dr. HIRSCHFELD im Staatlichen Institut für Blutgruppenserologie, Stockholm/Schweden. Alle Bestimmungen haben stets denselben Gc-Faktor für das betreffende Serum ergeben. Von diesen Testseren liefen bei jeder Elektrophorese mindestens 1 Vertreter jedes Gc-Typs mit, so dass dadurch eine zusätzliche Sicherheit für die Diagnose gewonnen wurde.

Anti-Gc-Serumfraktion

Für einige der schon längere Zeit eingefrorenen Seren, die zu verschiedenen Zwecken schon mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren und z.T. mit physiologischer Kochsalzlösung wieder verdünnt wurden, konnte ein experimentell gefundenes und mehrfach getestetes Spezialserum (für Versuchszwecke von den Behring-Werken zur Verfügung gestellt) verwendet werden, das ausser Antikörpern gegen das Gc-System nur noch Antikörper gegen das Albumin enthält. Da dieses Serum nur in geringer Menge vorhanden war, konnte es nur für besondere Fälle Verwendung finden (Vergl. hierzu weiter unten experimenteller Teil).

Diagnosetechnik

Zur Diagnose werden die noch feuchten Präparate mit einem schräg von unten einfallenden gebündelten Lichtstrahl durchleuchtet und durch eine Stativlupe betrachtet (HIRSCHFELD).

Die gefärbten Dauerpräparate werden auf eine von unten beleuchtete Milchglasscheibe gelegt und dann mit einer Hand- oder Stativlupe identifiziert.

Mit dieser Technik gelang es in fast allen Fällen übereinstimmende Resultate zu erzielen. (Zwei weiter unten angeführte bereits veränderte Familienseren bildeten eine Ausnahme).

EXPERIMENTELLER TEIL

Bevor die eigenen Untersuchungen routinemässig durchgefürt werden konnten, waren zeitraubende experimentelle Vorarbeiten notwendig. Es galt, jeden einzelnen der 10 Arbeitsgänge optimal und den gesamten Arbeitsgang so kontinuierlich wie nur möglich zu gestalten.

Giessen der Platten

Arbeitet man beim Giessen der Gelplatten allein, so sollte man nur 3 oder 4 Objektträger mit Gel beschichten (die Pipette etwa 1 mm senkrecht über die Mitte des Objektträgers halten und die Flüssigkeit ganz auslaufen lassen, sie verteilt sich auf gut gereinigten Gläsern von selbst gleichmässig ohne herunterzufliessen) und diese dann abdecken. Auf keinen Fall sollte man viele Objektträger nacheinander unter die Abdeckung legen, da bei jedem Aufheben des Deckels ein Zug entsteht, der die Verdunstung des Aqua dest. der Gelplatten unerwünscht beschleunigt. Deshalb ist es vorteilhaft wenn man mit zwei Hilfskräften jeweils 10 Gelplatten giesst und sie dann abdeckt.

Form und Anordnung der Stanzen

Von grosser Bedeutung sind die Dimensionen der Stanze. Es wurden verschiedene Stanzentypen in mehreren Versuchsreihen gegeneinander ausgewertet, bei denen gleichzeitig verschiedene Antihumanseren geprüft wurden.

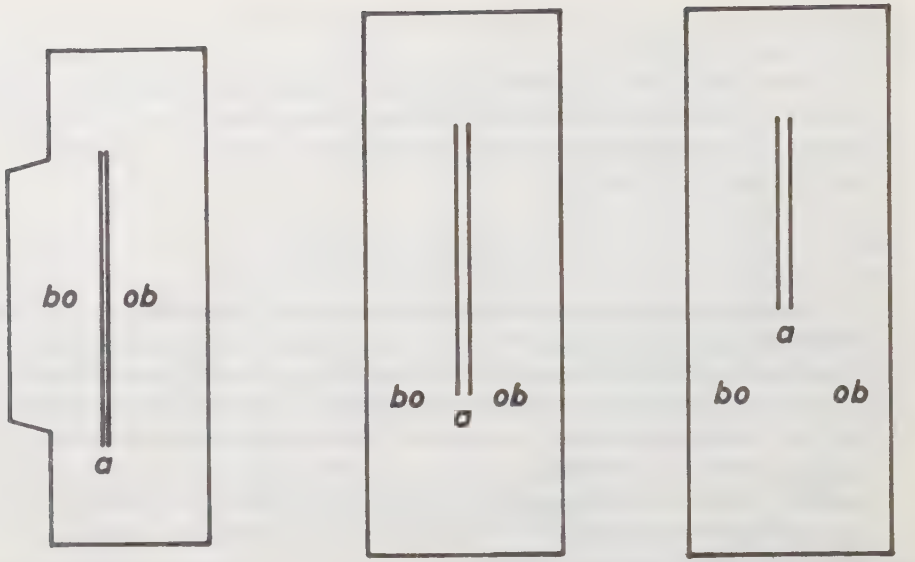
Als Stanzenkörper bewährte sich das in den Behring-Werken eingeführte Gerät (Abb. 5a). Der Originalstempel erwies sich jedoch mit seinen Ausmassen als ungünstig gegenüber den nach eigenen Angaben angefertigten Stempeln (Abb. 8). (siehe S. 22)

Alle Stanzen sind so gearbeitet dass die Messer gegeneinander ausgewechselt und in ihrer Längsrichtung beliebig verschoben werden können. Der Messerabstand kann jedoch von Stanze zu Stanze nicht geändert werden.

Bei der Originalstanze erwies sich der Abstand a-b mit 3 mm als zu gering, um charakteristische Unterschiede in der Diffusionsgeschwindigkeit der elektrophoretisch getrennten Serumproteine bei der Präzipitatbildung mit den ihnen aus dem Kanal entgegendiffundierenden Antikörpern deutlich feststellen zu können (Abb. 9).

Erst durch Vergrösserung des Abstandes a-b auf etwa die doppelte Entfernung (Abb. 8, Anfertigung 2 und 3) wird der Unterschied in der Diffusionsgeschwindigkeit so gross, dass im Bereich des Gc-Faktors Unterschiede zu erkennen sind (Abb. 9). (siehe S. 23)

Bei der Abb. 9 handelt es sich um einen kombinierten Test, geprüft werden verschiedene Stanzenformen und gleichzeitig verschiedene Antiseren unter Ver-



Originalstempel Anfertigung 2 Anfertigung 3

a) Messer: Länge	: 45,0 mm[+)]	35,0 mm	25,0 mn	
Höhe	: 5,0 "	5,0 "	5,0 "	
Stärke ca.	: 0,08 "	0,08 " (Rasierkl.)	0,08 "	(Rasierkl.
Abstand	: 1,0 "	1,8 "	1,8 "	
b) Injektionsnadel	: Nr.1	Ø 1,0 mm	Ø 1,2 mm	
Abstand a-b	: 3,0 mm	4,6 mm	5,4 mm	
b-b	: 7,0 "	11,0 "	12,6 "	

ABBILDUNG 8

Grundfläche der verschiedenen Stanzenstempel

wendung eines Testserums vom Typus Gc 1-1; 42 r, 39 l; 35 r, 32 l. Es werden die Originalstanze (1) und die eigene Stanze, Anfertigung 2 (2), sowie ein Antihumanserum vom Kaninchen (Behring-Werke, Op.Nr.130) (a) und ein Antihumanserum vom Pferd (Pasteur-Institut, Paris, Op.Nr.13415) (b) miteinander verglichen.

Es ist offensichtlich, dass durch die grössere Entfernung der Diffusionszentren der Antigene vom Antikörperkanal Unterschiede in der Diffusionsgeschwindigkeit sehr deutlich werden (2a, b), während diese auf der Abb.1a b viel weniger deutlich zu erkennen sind.

+) Angaben über Originalstempel nach Labor-Bl.d.Behring-Werke, 8.Jahrg., Febr.58, H.1, S.14.

1 b a 2 a b

ABBILDUNG 9

Kombinierter Stanzen-Antihumanserum-Test

1 Originalstanze
2 Eigene Stanze, Anfertigung 2
a Antihumanserum vom Kaninchen (Behr.-W., Op.Nr.130)
b Antihumanserum vom Pferd (Pasteur Inst., Op.Nr.13415)

Besonders auffällig ist weiterhin, dass das Antihumanserum vom Pferd (Op. Nr.13415) bei grösserer Diffusionsstrecke im Gc-Bereich bedeutend bessere Präzipitatbögen ergibt (2b), als das Antihumanserum vom Kaninchen (Op.Nr.130), das nur verschwommene Konturen, aber keine exakt zu diagnostizierenden Präzipitate hervorruft (2a). Bei der Originalstanze mit der kurzen Diffusionsstrecke verhalten sich diese Antihumanseren umgekehrt. 1a zeigt zwar mehr und deutlichere Präzipitate als 1b, lässt aber weniger klar den Typus Gc 1-1 dieses Serums erkennen als 2b.

Für die weitere Arbeit war deutlich genug erkennbar, welche Kombination von Stanze und Antihumanserum zu wählen war: 2b, eigene Stanze Anfertigung 2 bzw. Anfertigung 3 und Antihumanserum vom Pferd (Pasteur Institut, Op.Nr.13415) das in sehr reichlicher Menge beschafft werden konnte.

Die Stanze 2 wurde allgemein verwendet, während die Stanze 3 gelegentlich für eine Spezial-Antihumanserum-Fraktion Verwendung fand. Der Kanal dieser Stanze erstreckt sich nur über den Bereich der α-Globulinfraktionen, zu denen der Gc-Faktor gehört; bei dieser Anordnung ist der Verbrauch an Antiserum geringer.

Testreihe gegen verschiedene Teil-Antihumanseren

Von den Behring-Werken wurden 4 Antiseren zur Verfügung gestellt, um sie auf ihre Brauchbarkeit zur Bestimmung des Gc-Faktors zu überprüfen:

1) Anti-α_1-Globulinfraktion-Serum, Op.Nr. 86, (56 x),
2) Anti-α_2-Globulinfraktion-Serum, Op.Nr.346/47, (57 x),
3) Anti-ß-GlobulinfraktionSerum, Op.Nr.349/50, (52 x),
4) Anti-Humanserum inkomplett, Op.Nr.365, (53 x).(Abb.10)

Diese Antiseren vom Kaninchen wurden in 6 Versuchsreihen gegen alle 3 Gc-Typen (Gc 1-1, Gc 2-1, Gc 2-2) getestet. Dabei zeigt sich, dass keines dieser Antiseren zur Indentifikation für den Gc-Faktor geeignet ist (Abb.10).

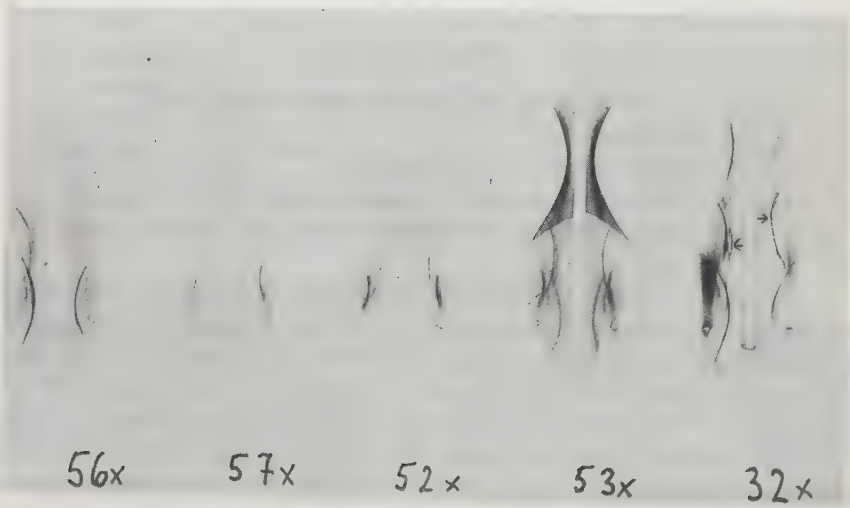


ABBILDUNG 10

Testreihe gegen 4 Antiseren und 1 Referenzserum (32 x)
Erklärung siehe Text.

Die Abbildung 10 zeigt die Präzipitatbilder dieser vier Antiseren nach der Immunoelektrophorese gegen ein Testserum (21639) des Typus Gc 2-2, (linke Seite jedes Objektträgers) und ein Testserum (21635) des Typus Gc 1-1 (rechte Seite jedes Objektträgers). Zum Vergleich daneben (32 x) die Präzipitatbilder derselben Testseren gegen ein brauchbares Antihumanserum vom Pferd (Pasteur-Inst. Nr. 13415).

Zwei weitere Antiseren, die von den Behring-Werken zur Überprüfung zur Verfügung gestellt wurden, brachten sehr gute Ergebnisse:

1) Anti-Serum vom Kaninchen, Op.Nr.3421
2) Anti-Serum vom Pferd , Op.Nr.3438.

Bei der durchgeführten Testreihe zeigte die vom Kaninchen gewonnene Fraktion zwar nur relativ schwache, doch absolut eindeutige Präzipitatbilder der Gc-Typen (Abb.11). Ausser den Gc-Präzipitaten ist hier nur noch der starke Präzipitatbogen des Albumins vorhanden; in dieser Fraktion sind praktisch nur Antikörper gegen die Antigene des Albumins und des Gc-Faktors enthalten.

Dieses Teil-Antihumanserum eignete sich besonders als Spezialserum für 6 schwer zu diagnostizierende, schon längere Zeit zu verschiedenen Zwecken mehrfach gebrauchte, immer wieder eingefrorene und aufgetaute Seren.

Das Anti-Gc-Faktor-Serum vom Pferd zeigte ebenfalls brauchbare Ergebnisse. Es enthielt ausser den Gc-Faktor- und Albumin-Antikörpern weitere Antikörper gegen drei Serumproteine in den α-Globulinfraktionen. Dadurch ist seine Brauchbarkeit als Spezial-Antiserum geringer als das oben genannte Antiserum vom Kaninchen.

Zum Bestimmen des Gc-Faktors im Blutserum ist eine Antiserum-Fraktion, die ausser dem Gc-Faktor nur noch das α_2-Makroglobulin entwickelt, am besten geeignet. Das α_2-Makroglobulin dient dabei zur Unterscheidung zwischen Gc 1-1 und Gc 2-2 (vergleiche oben, Differential Diagnose). (Abbildung siehe S.26)

Elektrophoretische Anordnung

Die Testreihen wurden unter verschiedenen elektrophoretischen Bedingungen durchgeführt:

1. Bei dem oben angeführten Pherographen wurde die Elektrophorese bei der Anordnung, wie sie Abb. 6b und 7b zeigt, im allgemeinen mit ca. 500 V Klemmenspannung und einer Stromstärke von ca. 110 mA begonnen (Stromregelung stufenweise, nicht kontinuierlich). Die Spannung über den Objektträgern betrug noch 140-150 V, so dass mit etwa 20 V/cm gearbeitet wurde. Die Stromstärke je Objektträger betrug ca. 8 mA. Bei einer Laufzeit von 50 Minuten hatte sich das Zentrum des Albumins 35-38 mm weit vom Einfüllpunkt zur Anode hin bewegt; damit war eine genügend starke Trennung der verschiedenen Fraktionen erreicht.

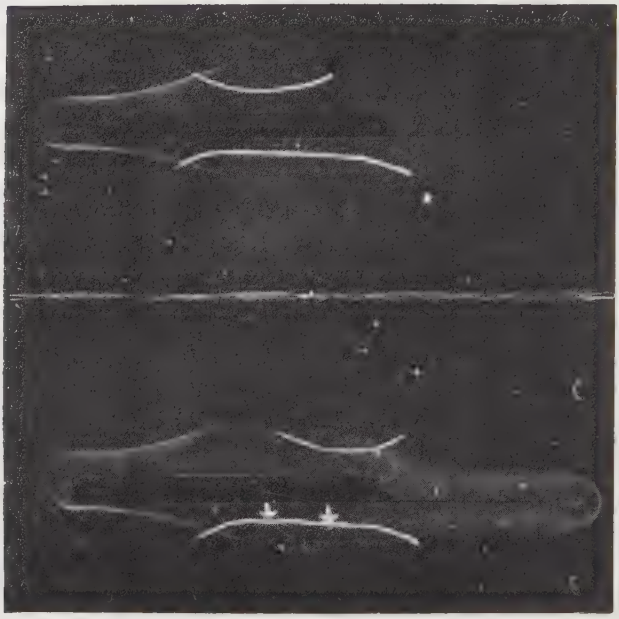


ABBILDUNG 11

Test gegen Anti-Gc-Faktor-Serum vom Kaninchen
(Stanze, Anf. 3)
A : Gc 1-1
C : Gc 2-2
B, D : Gc 2-1

2. Bei der Anordnung nach Abb. 12 wurden gleichzeitig 56 Seren (28 Objektträger) elektrophoretisch getrennt. Bei einer Spannung von 360 V über die 4 Objektträger-Reihen ergaben sich ca. 11 1/2 V/cm. Die Stromstärke betrug bei dieser Anordnung über alle 7 Objektträger-Bahnen etwa 42-44 mA, je Bahn also etwa 6 mA. Um den gleichen Trennungseffekt zu erzielen, musste die Laufzeit auf 70 Minuten verlängert werden.

Die Anordnung 2 hat gegenüber 1 den Vorteil, dass die doppelte Anzahl Seren in nur wenig längerer Zeit getrennt werden können. Beide Anordnungen bedürfen einer ständigen Überwachung der Stromstärke, die durch unterschiedlich starke Belastung des Labornetzes häufig schwankte.

3. Um diese Störungen zu umgehen, wurde nach persönlicher Aussprache mit Herrn Dr. HIRSCHFELD eine Niederspannungselektrophorese angewendet. Bei der oben

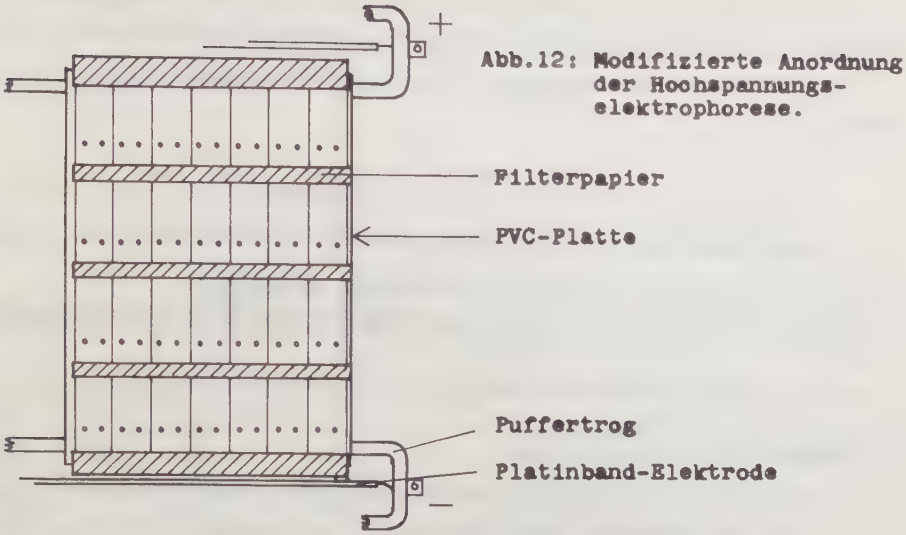


Abb.12: Modifizierte Anordnung der Hochspannungs-elektrophorese.

ABBILDUNG 12

Modifizierte Anordnung der Hochspannungs-Elektrophorese

abgebildeten Anordnung (Abb. 6a u. 7a) erreicht man mit dem kontinuierlich zu schaltenden Gerät eine Spannung von 190-210 V und eine Stromstärke von 23-24 mA. Pro Objektträger-Bahn erhält man also ca. 3 mA und etwa 6,5 V/cm. Die Laufzeit beträgt 2 Stunden. Diese Anordnung wurde als die bestgeeignete für alle weiteren Untersuchungen benutzt.

Obgleich die Dauer der Elektrophorese bei der Anordnung 3 wegen der geringen Stromstärke bedeutend grösser ist, hat die Niederspannungs-Elektrophorese gegenüber der Hochspannungs-Elektrophorese den wesentlichen Vorteil, dass die Apparatur während des Stromdurchgangs nicht überwacht werden muss und diese Zeit für weitere Arbeiten frei wird.

In allen 3 Anordnungen waren die Brücken-Tröge mit je 700 ml Brückenpuffer gefüllt; der Strom wird durch eine Platinband Elektrode, die sich am Boden jedes Troges befindet, übertragen.

Zur Verbindung der Brückenpuffer mit dem Gel diente ein Filterkartonstreifen der Nr. 598 Schleicher & Schüll, der sich als besonders geeignet erwiesen hatte.

Die Brückenpuffer werden jeweils nur für einen Elektrophorese-Durchlauf verwendet.

Versuche zur Dokumentation

Zur Dokumentation der Ergebnisse sind mehrere Möglichkeiten geprüft worden:

1. Nativ-Photographie der Präzipitate unter Wasser und trocken.
2. Benutzung der Nativpräparate als photographisches Negativ im Vergrösserungsgerät.
3. Amido Schwarz-Färbung der Präzipitate und deren Photoreproduktion.

1. Photographie der Nativpräparate:

a) Unter Wasser: Im Anschluss an die Nativ-Diagnose werden jeweils 2 Objektträger in einer Petrischale unter Aqua dest. in zwei schräg von unten durchtretenden, gebündelten Lichtstrahlen über dunklem Untergrund photographiert. (Abb. 13).

Die Belichtungszeit ist abhängig von der Stärke der Präzipitate : 2-4 sec.

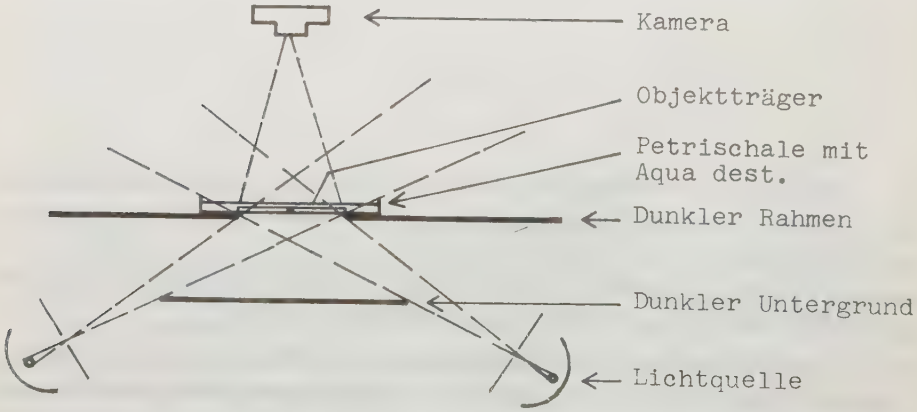


ABBILDUNG 13

Schema der Nativ-Photographie unter Wasser.

b) Trocken: Für die Nativ-Trocken-Photographie kann man dieselbe Apparatur verwenden, wie zur Unterwasser-Photographie. Die Objektträger werden auf

einen Tragrahmen photographiert.

Zur Vereinfachung dieser Methode wurde (nach persönlicher Aussprache mit HIRSCHFELD) folgendes Gerät gebaut:

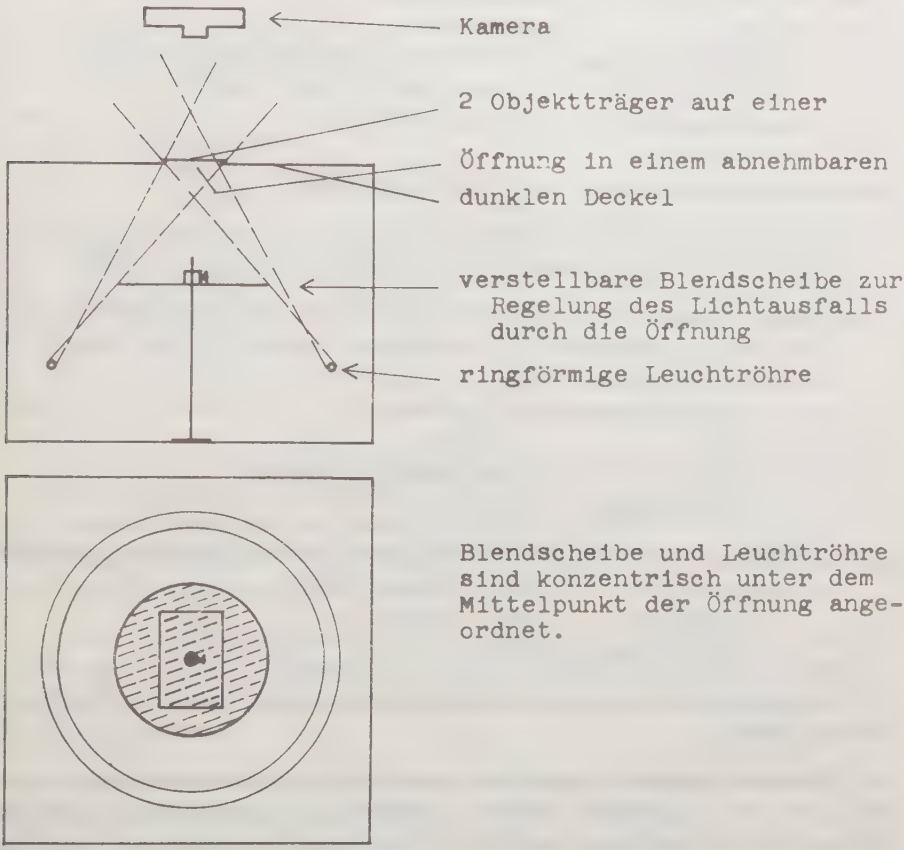


ABBILDUNG 14

Gerät zur Nativ-Trocken-Photographie

Die Aufnahmen mit diesem Gerät zeigen im allgemeinen gute Reproduktionen der Originale.

Zur Dokumentation werden nur die Negative entwickelt.

Als Kamera diente eine Leica F 2, als Filmmaterial Dokumentenfilm der Firma Agfa.

2. Vergrösserung der Nativpräzipitate:

Jeweils zwei Objektträger werden in eine mit Aqua dest. gefüllte Petrischale gelegt, deren Boden um die Objektträger herum mit dunkler Folie abgedeckt wird. An Stelle der Filmnegative wird die Petrischale auf die Filmbühne des Vergrösserungsapparates gestellt und bei gewünschter Vergrösserung belichtet (Abb. 11).

Vergrösserungsapparat	: handelsüblich; Negativbühne 6 x 9
Photopapier	: Lupexpapier, extrahart, (Agfa),
Belichtungszeit	: 2-3 sec.

3. Färbung der Präzipitate und deren Photoreproduktion:

a) Die Färbung mit Amido-Schwarz und die damit verbundenen Arbeiten sind oben unter "Dokumentation" bereits ausführlich beschrieben worden.

b) Photographie der Dauerpräparate: Die gefärbten Präzipitate werden in schräg von oben durchfallendem Licht im Reproduktionsgerät photographiert (Abb. 1a und 10, vergrösserte Positive).

Reproduktionsgerät	: Leitz, Wetzlar
Kamera	: Leica F 2
Film	: Dokumentenfilm (Agfa)
Belichtungszeit	: 1-1,5 sec.

c) Kontaktverfahren: Die gefärbten Präparate werden direkt auf das Photopapier gelegt und senkrecht von oben belichtet (Abb. 9).

Photopapier	: Lupex, extrahart
Belichtungszeit	: 1-2 sec.

Zur Dokumentation der eigenen Ergebnisse wurde die Färbung mit Amido-Schwarz gewählt.

Die photographische Reproduktion wurde ihres grösseren technischen Aufwandes wegen nur als ergänzende Methode verwendet. Ihre Vorteile liegen in der kurzfristigen Erstellung dokumentationsfähiger Unterlagen; dauert doch die Herstellung der gefärbten Präparate 5-6 Tage, bedingt durch die lange Wässerungs- und Trockenzeit.

UNTERSUCHUNGSGUT

Das Untersuchungsgut gliedert sich wie folgt:

TABELLE 2

	Bezeichnung der Stichprobe	Anzahl	Herkunft
1.	Blutspender aus Oberbayern	208	Blutspenderzentrale +) München
2.	Familien (BRD) Väter Mütter Kinder	 134 134 250	Aus dem Archiv des Insitituts f. Anthropol. u. Humangenetik; eigene Sammlung
3.	Mutter-Kind-Paare (Süddeutschland) Mütter Kinder	 251 251	Aus forensischen Gutachten des Instituts f. Anthropol. u. Humangenetik
	Gesamt	1228	

Die Familienseren stammen zum Teil aus einer Sammelaktion, die im Rahmen blutgruppengenetischer Untersuchungen von Herrn Prof. Dr. Dr. K. SALLER und den Assistenten seines Instituts durchgeführt wurde; ich danke den Herren für die Überlassung dieser Seren. Einen Teil der Familienseren habe ich auch durch persönliche Werbung von Familien gewonnen.

Unter den Seren des Instituts-Archivs waren einige, offenbar durch das lange Lagern oder zu häufiges Auftauen, nicht mehr brauchbar; das gesamte Präzipitatbild dieser Seren war atypisch. Wir haben sie (2 Elternpaare mit zusammen 4 Kindern) ausgeschieden.

In einer weiteren Familie waren die Abstammungsverhältnisse für ein Kind unklar; dieses Kind blieb unberücksichtigt.

+) Herrn Dr. med. habil. L. RASCH danke ich verbindlichst für die Überlassung der Seren.

Phänotypen- und Allelenhäufigkeit

TABELLE 3

Häufigkeit (absolut und relativ) der Phänotypen des Gc-Systems (eigene Untersuchungen)

Stichprobe	N	Phänotypen		
		Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2
Blutspender	208	119	68	21
	%	57,21	32,69	10,10
Mutter-Kind-Paare				
a) Mütter	251	143	88	20
	%	56,97	35,06	7,97
b) Kinder	251	132	97	22
	%	52,59	38,65	8,76
Familien				
a) Eltern	264	140	109	15
	%	53,03	40,29	5,68
b) Kinder	246	147	86	13
	%	59,76	34,96	5,28
Kinder gesamt	497	279	183	35
	%	56,14	36,82	7,04

Zieht man in der Tabelle die Stichproben zusammen, die voneinander unabhängig sind (Blutspender, Mütter, Eltern), dann ergeben sich folgende absolute und relative Phänotypenhäufigkeiten (Tab. 4):

TABELLE 4

Stichprobe	N	Phänotypen		
		Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2
Blutspender	208	119	68	21
(Oberbayern)	%	57,21	32,69	10,10
Mütter	251	143	88	20
(Süddeutschland)	%	56,97	35,06	7,97
Eltern	260	139	106	15
(B.R.D.)	%	53,46	40,77	5,77
Gesamt	719	401	262	56
	%	55,77	36,45	7,78

Die in den Tabellen 3 und 4 zusammengestellten relativen Phänotypenhäufigkeiten zeigen eine recht gute Übereinstimmung mit den von HIRSCHFELD mitgeteilten Ergebnissen (Tab. 5)

TABELLE 5

Absolute und relative Phänotypenhäufigkeit
einer schwedischen Durchschnittsbevölkerung
(HIRSCHFELD)

N	Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2
1744	972	649	123
%	55,73	37,21	7,05

Eine Gegenüberstellung mit den übrigen bisher bekannten Phänotypenhäufigkeiten gibt die Tabelle 6:

TABELLE 6

Autor	Population	N	Phänotypen		
			Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2
HIRSCHFELD	Schweden +)	1744	972	649	123
		%	55,73	37,21	7,05
	England +)	49	24	22	3
		%	48,98	44,90	6,12
REINSKOU	Norwegen +)	383	202	149	32
		%	52,74	38,90	8,36
MANSA OLSEN	Dänemark +)	126	74	46	6
		%	58,73	36,51	4,76
CLEVE and BEARN	USA, Weisse	122	63	49	10
		%	51,64	40,16	8,20
	Eskimo	67	34	26	7
		%	50,75	38,80	10,45
	Chinesen USA	117	72	36	9
		%	61,54	30,77	7,69
	Indianer (Navajos)	245	235	9	1
		%	95,92	3,67	0,41
	Fulani (Nigeria)	100	90	10	-
		%	90,0	10,0	0
	Habe (Nigeria)	103	88	15	-
		%	85,44	14,56	0
	Neger, USA	144	116	25	3
		%	80.56	17,36	2,08
HIRSCHFELD	Neger +) (Jamaika)	24	21	3	-
		%	87,50	12,50	0
	Neger +) (Afrika)	288	238	48	2
		%	82,64	16,67	0,69
	Lappen	79	60	18	1
		%	75,95	22,78	1,27
Eigene Ergebnisse	Deutschland	719	401	262	56
		%	55,77	36,44	7,79

Die mit der Methode der Genzählung errechneten Allelenhäufigkeiten in den einzelnen Stichproben sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

+) Persönliche Mitteilung von HIRSCHFELD

TABELLE 7

Allelenhaufigkeit in den Stichproben der eigenen Untersuchungen

	Stichprobe	Allele des Gc-Systems	
		Gc^1	Gc^2
a)	Blutspender	0,736	0,264
b)	Mutter-Kind-Paare		
	Mütter	0,745	0,255
	Kinder	0,719	0,281
c)	Familien		
	Eltern	0,737	0,263
	Kinder	0,772	0,228
d)	Unabhängige aus a), b), c)	0,740	0,260

Prüfung auf Durchmischung:

Die Proportion der drei Phänotypen entspricht in unserem Untersuchungsgut von 719 unabhängigen Probanden durchaus dem Erwartungswert des HARDY-WEINBERG-Gleichgewichtes. In der Tabelle 8 sind den Beobachtungswerten die Erwartungswerte gegenübergestellt, die aus den Allelenhäufigkeiten (Tab. 7) errechnet wurden. Die Übereinstimmung ist sehr gut.

TABELLE 8

Gegenüberstellung der beobachteten Phänotypenhäufigkeiten mit dem Erwartungswert unter der Hypothese vollständiger Durchmischung (Panmixie)

	Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2	Summe
Deutschland				
beob.	401	262	56	719
erwartet	402,6	266,0	50,3	718,9
χ^2	0,00636	0,06015	0,64592	
Schweden				
beob.	972	649	123	1744
erwartet	963,8	665,3	114,8	1743,9
χ^2	0,06977	0,39935	0,58571	

Zur Populationsgenetik des Gc-Systems

In der Tabelle 9 sind die bisher bekannten Daten über die Allelenhäufigkeit bei verschiedenen Populationen zusammengestellt.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist zu ersehen, dass für die bisher untersuchten weissen Populationen (sowohl Europa als auch Amerika) die Allelenhäufigkeit für Gc^1 etwa um 0,740 liegt. Der niedrigste Wert von 0,714 wurde für eine Stichprobe von 49 Personen aus England von HIRSCHFELD angegeben, der höchste mit 0,770 für 126 Personen aus Dänemark (OLSEN). Ebenfalls dieser Gruppe ähnlich sind die von CLEVE und BEARN untersuchten Eskimo mit einer Frequenz von 0,7015 (dem bisher niedrigsten Wert für Gc^1). Die von CLEVE und BEARN untersuchten Chinesen aus den USA weichen mit 0,77 auch nur wenig von den europäischen Gruppen ab; deutlicher isoliert stehen die Neger und Indianer, die mit einer grösseren Häufigkeit des Allels Gc^1 (meist über 0,9) eine geschlossenere Gruppe bilden. Auch die Lappen (Schweden) haben mit 0,87 eine hohe Frequenz für Gc^1.

TABELLE 9

Allelenhäufigkeit der bisher untersuchten Populationen

Autor	Population	Gc^1	N
HIRSCHFELD +)	England	0,714	49
CLEVE u. BEARN	USA, Weisse	0,7172	122
REINSKOU +)	Norwegen	0,722	383
HIRSCHFELD +)	Schweden	0,743	1744
MANSA OLSEN +)	Dänemark	0,770	126
CLEVE u. BEARN	Eskimo	0,7015	67
CLEVE u. BEARN	USA, Chinesen	0,7693	117
HIRSCHFELD	Lappen (Schweden)	0,873	79
CLEVE u. BEARN	USA, Neger	0,8924	144
HIRSCHFELD +)	Neger, Jamaica	0,938	24
HIRSCHFELD +)	Neger, Afrika	0,910	288
CLEVE u. BEARN	Habe, Nigeria	0,9272	103
CLEVE u. BEARN	Fulani, Nigeria	0,950	100
CLEVE u. BEARN	Indianer	0,9765	245
Eigene Ergebnisse	Deutschland	0,740	719

Familienuntersuchungen

Tabelle 10 zeigt die Gliederung der von uns untersuchten 132 Familien mit ihren 246 Kindern, aufgeteilt nach der Zugehörigkeit zu den drei Phänotypen des Gc-Systems.

+) Persönliche Mitteilung von HIRSCHFELD.

TABELLE 10

Aufteilung der Gc-Typen bei 132 Familien

Eltern-Kombination		N	Anzahl der Kinder mit dem Typus			χ^2	N
Gc	Gc		Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2		
1-1	1-1	32	63 (63) +)	-	-	-	63
1-1	2-1	67	73 (62,5)	52 (62,5)	-	3,52800	125
1-1	2-2	9	-	12 (12)	-		12
2-1	2-1	18	11 (8,5)	14 (17)	9 (8,5)	1,29411	34
2-1	2-2	6	-	8 (6)	4 (6)	1,33333	12
2-2	2-2	-	-	-	-	-	-
Gesamt		132	147 (146,6) ++)	86 (86,6)	13 (12,8)	6,15544	246

Bei den Familienuntersuchungen wurden die beiden oben angeführten Familien (siehe Untersuchungsgut) ausgeschlossen, ausserdem musste ein Kind des Gc-Typs 1-1 ausscheiden, da auf Grund der Hp-Bestimmung die Vaterschaft des Ehemannes zweifelhaft erschien.

Die Proportion der Phänotypen ist bei den 246 Kindern unserer 132 Familien besonders gut übereinstimmend mit den Erwartungswerten bei vollständiger Durchmischung (vgl. letzte Zeile der Tabelle 10). Jedoch ist die Aufspaltung der 125 Kinder aus der Elternkombination Gc 1-1 x Gc 2-1 in die Phänotypen Gc 1-1 und Gc 2-1 nicht so gut übereinstimmend mit den Erwartungswerten (Defizit an Heterozygoten). Immerhin ist aber doch noch der χ^2-Wert 6,155 bei Prüfung der gesamten Tafel (4 Freiheitsgrade) im Bereich der Zufallsgrenzen liegend.

Die Tabelle zeigt, dass die Aufspaltung der drei Gc-Typen in der Kindergeneration den Regeln für einen autosomalen 2-Allelen-Erbgang entspricht. Die Befunde bestätigen die von HIRSCHFELD, JONSSON und RASMUSSON aufgestellte Hypothese: In der Eltern-Kombination Gc 1-1 x Gc 1-1 treten nur Kinder vom Typus Gc 1-1 auf; die Eltern-Kombination Gc 1-1 x Gc 2-1 hat nur Kinder vom Ty-

+) erwartete Spaltungsziffer unter der Hypothese des einfachen 2-Allelen-Erbganges mit Unterscheidbarkeit der 3 Phänotypen.

++) Erwartungswerte unter der Hypothese vollständiger Durchmischung, errechnet aus den Allelenhäufigkeiten $Gc^1 = 0,772$, $Gc^2 = 0,228$ (vergl. Tab.7).

pus Gc 1-1 und Gc 2-1, während erwartungsgemäss der Kindertypus Gc 2-2 fehlt. Aus der Eltern-Kombination Gc 1-1 x Gc 2-2 gehen nur Kinder mit dem heterozygoten Typus Gc 2-1 hervor, die Typen Gc 1-1 und Gc 2-2 fehlen. Die doppelt heterozygote Eltern-Kombination Gc 2-1 x Gc 2-1 lässt Kinder aller drei Typen zu (theoretisch in der Proportion 1 : 2 : 1). Die Eltern-Kombination Gc 2-1 x Gc 2-2 hat nur Kinder vom Typus Gc 2-1 und Gc 2-2, der Typus Gc 1-1 fehlt erwartungsgemäss. Die Eltern-Kombination Gc 2-2 x Gc 2-2 kommt in unserem Untersuchungsgut nicht vor.

In den Tabellen 11 und 12 werden zum Vergleich die von HIRSCHFELD sowie CLEVE und BEARN untersuchten Familien gebracht.

TABELLE 11

Aufteilung der Gc-Typen bei schwedischen Familien
(nach HIRSCHFELD)

Eltern-Kombinationen		N	Anzahl der Kinder mit dem Typus			χ^2	N
Gc	Gc		Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2		
1-1	1-1	13	54 (54,0)	-	-	-	54
1-1	2-1	20	25 (29,5)	34 (29,5)	-	1,373	59
1-1	2-2	4	-	11 (11,0)	-	-	11
2-1	2-1	5	3 (3,3)	8 (6,6)	2 (3,3)	0,836	13
2-1	2-2	-	-	-	-	-	-
2-2	2-2	-	-	-	-	-	-
Gesamt		42	82	53	2	2,21	137

TABELLE 12

Aufteilung der Gc-Typen bei Familien von
a) Weissen aus USA,
b) Nigerianern,
c) Indianern.
(CLEVE u. BEARN)

Eltern-Kombinationen Gc	Gc	N	Anzahl der Kinder mit dem Typus Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2	χ^2	N
a)							
1-1	1-1	7	9 (9)	-	-	-	9
1-1	2-1	16	21 (20,5)	20 (20,5)	-	0,02440	41
1-1	2-2	4	-	6 (6)	-	-	6
2-1	2-1	3	3 (1,75)	3 (3,5)	1 (1,75)	1,28572	7
2-1	2-2	1	-	1 (0,5)	- (0,5)	1,000	1
2-2	2-2	-	-	-	-	-	-
Gesamt		31	33	30	1	2,31012	64
b)							
1-1	1-1	14	29 (29)	-	-	-	29
1-1	2-1	10	17 (14)	11 (14)	-	1,28572	28
2-1	2-1	1	- (0,75)	2 (1,5)	1 (0,75)	1,75000	3
Gesamt		25	46	13	1	3,03572	60
c)							
1-1	1-1	11	43	-	-	-	43

Zwillingsuntersuchungen

Die von uns untersuchten Familien waren z.T. im Hinblick darauf gesammelt worden, dass unter den Kindern Zwillinge vorhanden sind. Insgesamt haben wir unter den 246 Kindern aus 132 Familien 28 Zwillinge (56 Individuen), darunter 12 EZ-Paare, 16 ZZ-Paare. Die 12 EZ-Paare stimmen ausnahmslos hinsichtlich ihres Gc-Typus überein (die Diagnose der Eineiigkeit war unabhängig vom Gc-Typus vor-

genommen worden); von den 16 ZZ-Paaren haben 9 einen übereinstimmenden Gc-Typus (Konkordanz), 7 ZZ-Paare sind diskordant.

Mutter-Kind-Verbindungen

Die folgenden Tabellen 13 und 14 zeigen die Verteilung der Gc-Phänotypen bei den von uns bisher untersuchten Mutter-Kind-Paaren, aufgegliedert in zwei Stichproben, die zeitlich nacheinander erhoben wurden.

TABELLE 13

Stichprobe I.

Mütter Gc	N	χ^2	Anzahl der Kinder mit dem Typus			χ^2	N
			Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2		
1-1	102 (98,1)	0,15505	71 (75)	31 (27)	-	0,80593	102
2-1	65 (73,1)	0,89754	26 (25)	30 (31,5)	9 (8,5)	0,14084	65
2-2	18 (13,8)	1.27826	-	11 (13,5)	7 (4,5)	1,85184	18
Gesamt	185	2,33085	97 (100)	72 (72)	16 (13)	2,80261	185

Allelenhäufigkeit:

	Mütter	Kinder
Gc^1 :	0,727	0,719
Gc^2 :	0,273	0,281

TABELLE 14

Stichprobe II.

Mütter Gc	N	χ^2	Anzahl der Kinder mit dem Typus			χ^2	N
			Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2		
1-1	41 (36,6)	0,52896	25 (30)	16 (11)	-	3,00606	41
2-1	23 (25)	0,16000	10 (8,5)	8 (11,5)	5 (3)	2,66326	23
2-2	2 (4,3)	1,23023	-	1 (1,5)	1 (0,5)	0,66666	2
Gesamt	66	1,91919	35 (38,5)	25 (24)	6 (3,5)	6,33598	66

Allelenhäufigkeit

	Mütter	Kinder
Gc^1 :	0,795	0,720
Gc^2 :	0,205	0,280

Die Tabelle 15 zeigt dann die Zusammenfassung dieser beiden Stichproben; sie enthält 251 Mutter-Kind-Paare, die aus forensischen Gutachten stammen.

Die aus den Familienuntersuchungen bekannten und zu erwartenden Gesetzmässigkeiten, die auf einen einfachen monomeren Erbgang hinweisen, sind auch hier sicher zu beobachten:

Keine Mutter vom Typus Gc 1-1 hat ein Kind vom Typus Gc 2-2; und umgekehrt: Keine Mutter vom Typus Gc 2-2 hat ein Kind vom Typus Gc 1-1-

Die für die einzelnen Gruppen errechneten Allelenhäufigkeiten (Vgl. Tab.7) halten sich wieder im Rahmen des zu erwartenden Durchschnittswertes unserer Population.

Stichproben I + II

Mütter Gc	N	χ^2	Anzahl der Kinder mit dem Typus			χ^2	N
			Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2		
1-1	143 (139,2)	0,10374	96 (107)	47 (36)	-	4,49195	143
2-1	88 (95,4)	0,57400	36 (32,5)	38 (44)	14 (11,5)	1,72858	88
2-2	20 (16,3)	0,83988	-	12 (15)	8 (5)	2,40000	20
Gesamt	251	1,51762	132 (139,5)	97 (95)	22 (16,5)	8,62053	251

Allelenhäufigkeit:

	Mütter	Kinder
Gc^1 :	0,745	0,719
Gc^2 :	0,255	0,281

Korrelationen

Um zu prüfen, ob die Gc-Serumgruppen von den ABO-Blutgruppen und weiteren Blut- und Blutserum-Gruppen unabhängig sind, wurden Korrelationstafeln aufgestellt.

Für jeden Fall dieser Tafeln sind die empirischen Erfahrungswerte angegeben, die Erwartungswerte unter der Hypothese der Unabhängigkeit sind in Klammern beigefügt.

Tabelle 16 zeigt die Überprüfung von 301 Probanden, bei denen der Gc-Typus, die ABO-Blutgruppen und die Haptoglobintypen bestimmt wurden.

Gc-, ABO- und Hp-System

	Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2	N
A_1	64 (57,09)	30 (33,49)	2 (5,42)	96
A_2	13 (16,65)	14 (9,77)	1 (1,58)	28
B	16 (23,19)	19 (13,60)	4 (2,2)	39
A_1B	12 (10,8)	6 (6,18)	- (1,01)	18
A_2B	2 (1,2)	- (0,6)	- (0,1)	2
O	72 (70,17)	36 (41,16)	10 (6,66)	118
Gesamt %	179 59,5	105 34,8	17 5,6	301
Hp 1-1	21 (26,14)	20 (14,86)	2 (2)	43
Hp 2-1	97 (95,45)	51 (54,25)	9 (7,3)	157
Hp 2-2	65 (61,41)	33 (34,89)	3 (4,69)	101
Gesamt %	183 60,1	104 34,5	14 5,4	301

In der nachfolgenden Tabelle 17 wird das Gc-System auf seine Unabhängigkeit vom MN-, Ss- und Pp-System geprüft.

TABELLE 17

Gc-, Mn-, Ss- und Pp-System

	Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2	N
M	57 (59,33)	34 (33,90)	8 (5,76)	99
N	36 (28,76)	12 (16,44)	- (2,79)	48
MN	82 (86,90)	54 (49,65)	9 (8,44)	145
Gesamt %	175 59,9	100 34,2	17 5,8	292
SS	12 (12,04)	5 (6,74)	3 (1,22)	20
ss	75 (71,65)	41 (40,09)	3 (7,25)	119
Ss	81 (84,30)	48 (47,17)	11 (8,53)	140
Gesamt %	168 60,2	94 33,6	17 6,1	279
P	49 (46,23)	21 (21,94)	6 (7,85)	76
p	10 (12,77)	7 (6,06)	4 (2,16)	21
Gesamt %	59 60,1	28 29,5	10 10,3	97

Aus den oben angeführten Tabellen ist zu ersehen, dass die Erfahrungs- und Erwartungswerte recht gut miteinander übereinstimmen.

Bei 37 Elternpaaren mit 62 Kindern wurden die oben angeführten Gruppen gemeinsam verglichen (Tabelle 18).

TABELLE 18

	Eltern				Kinder			
	Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2	N	Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2	N
A_1	17 (14,8)	6 (8,4)	3 (2,8)	26	14 (10,5)	6 (8,1)	1 (2,4)	21
A_2	7 (6,8)	5 (3,9)	0 (1,2)	12	2 (4,0)	6 (3,1)	0 (0,9)	8
B	2 (3,4)	3 (2,2)	1 (0,4)	6	2 (3)	2 (2,3)	2 (0,7)	6
A_1B	2 (1,7)	1 (0,9)	0 (0,3)	3	0	0	0	0
A_2B	0	0	0	0	0	0	0	0
O	14 (15,3)	9 (8,7)	4 (2,9)	27	13 (13,5)	10 (10,4)	4 (3,1)	27
Gesamt	42	24	8	74	31	24	7	62
Hp 1-1	8 (8,3)	7 (4,8)	0 (1,8)	15	5 (4,5)	3 (3,5)	1 (1,0)	9
Hp 2-1	12 (14,4)	9 (8,4)	5 (3,2)	26	10 (11,0)	11 (8,5)	1 (2,5)	22
Hp 2-2	21 (18,3)	8 (10,7)	4 (4,0)	33	16 (15,5)	10 (12,0)	5 (3,5)	31
Gesamt	41	24	9	74	31	24	7	62
M	10 (11,9)	9 (6,8)	2 (2,3)	21	8 (8)	5 (6,2)	3 (1,8)	16
N	11 (9,7)	5 (5,5)	1 (1,8)	17	8 (5)	2 (3,9)	0 (1,1)	10
MN	21 (20,4)	10 (11,7)	5 (3,9)	36	15 (18)	17 (14)	4 (4)	36
Gesamt	42	24	8	74	31	24	7	62
SS	6 (4,5)	2 (2,6)	0 (0,9)	8	3 (4)	2 (3,9)	3 (1,0)	8
ss	20 (19,3)	12 (11,0)	2 (3,7)	34	16 (15)	13 (11,3)	1 (3,7)	30
Ss	16 (18,2)	10 (10,3)	6 (3,5)	32	12 (12)	9 (9,3)	3 (2,7)	24
Gesamt	42	24	8	74	31	24	7	62
P	34 (32,9)	18 (18,8)	6 (6,3)	58	25 (25,5)	22 (19,7)	4 (5,8)	51
p	8 (9,1)	6 (5,2)	2 (1,7)	16	6 (5,5)	2 (4,3)	3 (1,2)	11
Gesamt	42	24	8	74	31	24	7	62

Die Häufigkeit, mit der hier die verschiedenen Typen des Gc-Systems von den einzelnen Gruppen beansprucht werden, entspricht trotz der relativ geringen Familienzahl recht gut den beobachteten prozentualen Phänotypenhäufigkeiten des Gc-Systems (Tabelle 19).

angeführten 132 Elternpaaren sind in Tabelle 21 zusammengestellt.

TABELLE 21

Beobachtete Paarungshäufigkeiten und Paarungserwartungen im Gc-System

Väter	Mütter			χ^2
	Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2	
Gc 1-1				
beobachtet	32	36	4	
erwartet	40	26	6	6,11281
Gc 2-1				
beobachtet	31	18	4	
erwartet	29,7	19,1	4,2	0,12934
Gc 2-2				
beobachtet	5	2	0	
erwartet	4	2,5	0,5	0,85000
				7,09215

Die Übereinstimmung zwischen beobachteten und erwarteten Häufigkeiten ist nicht sehr gut; insbesondere ist der Eltern-Typus Vater Gc 1-1 x Mutter Gc 2-1 erheblich häufiger als zu erwarten wäre; dafür ist der Typus Gc 1-1 x Gc 1-1 zu selten. Diese Diskrepanzen tragen die höchsten χ^2-Teilwerte. Insgesamt ist der χ^2-Wert 7,09 bei zwei Freiheitsgraden (unter Nichtberücksichtigung der letzten, stark unterbesetzten Zeile) noch im Bereich der Zufallsgrenzen, so dass also die Gesamtanordnung der Tafel durchaus noch eine Übereinstimmung der beobachteten mit den erwarteten Werten anzeigt.

DISKUSSION

Die eigenen Untersuchungen über die Genetik des Gc-Systems erbrachten erstmals Ergebnisse aus Deutschland. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Genfrequenzen für die von uns untersuchten süddeutschen Stichproben weitgehend übereinstimmen mit den Ergebnissen aus anderen europäischen Populationen. Bei allen diesen Gruppen liegt die Genfrequenz für Gc^1 über 0,70. Bemerkenswert erscheint im Vergleich mit anderen Gruppen, dass bei keiner Population eine niedrigere Frequenz als 0,70 zu finden ist. Sehr hohe Frequenzen (über 0,90) für Gc^1 haben die bisher untersuchten Neger- und Indianer-Populationen.

Wie dieser Polymorphismus gesteuert wird, ist noch ganz ungeklärt. Bisher liegen noch keinerlei Anhaltspunkte dafür vor, dass einer der drei Phänotypen für seinen Träger einen Selektionsvorteil oder -nachteil mit sich bringt. Auch über Beziehungen zu Krankheiten ist nichts bekannt.

Die eigenen Familienuntersuchungen sprechen für die 2-Allelen-Hypothese. Die bisher vorliegenden Familienuntersuchungen sind zahlenmässig noch wenig umfangreich. So konnte HIRSCHFELD bisher erst über 42 Familien mit 137 Kindern berichten; CLEVE und BEARN untersuchten 31 weisse Familien mit 64 Kindern, 25 Familien aus Nigeria mit 60 Kindern und 11 Indianerfamilien mit 43 Kindern. Mit dem jetzt hier vorgelegten Familienmaterial erhöht sich das Gesamtuntersuchungsgut an Familien auf 241 mit 550 Kindern. Dieses Untersuchungsgut bestätigt die 2-Allelen-Hypothese. Aus der Eltern-Kombination Gc 1-1 x Gc 1-1 sind wie zu erwarten nur Kinder vom Typus Gc 1-1 hervorgegangen;aus der Elternkombination Gc 2-2 x Gc 2-2 entstammen nur Kinder vom Typus Gc 2-2. Die Aufspaltung in die 3 Phänotypen bei den Kindern aus den Verbindungen Gc 2-1 x Gc 2-1 bzw. Gc 2-2 x Gc 1-1, Gc 2-1 x Gc 1-1, Gc 2-1 x Gc 2-2 entspricht der Erwartung, wie sie für ein 2-Allelen-System anzunehmen ist. Auch die Mutter-Kind-Verbindungen ergaben eine Bestätigung dieser Hypothese: Keine Mutter vom Typus Gc 2-2 hat ein Kind vom entgegengesetzt homozygoten Typus Gc 1-1; und umgekehr hat keine Mutter vom Typus Gc 1-1 ein Kind vom Typus Gc 2-2.

Die Untersuchung darauf, ob das Gc-System zu einem der bekannteren Blutgruppensysteme Beziehungen aufweist, brachte in Übereinstimmung mit den Befunden von HIRSCHFELD keine eindeutigen Korrelationen. Die Befunde sprechen dafür, dass Unabhängigkeit vorliegt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Technik der Immunoelektrophorese nach GRABAR-WILLIAMS in der Mikromodifikation nach SCHEIDEGGER wird mehrfach modifiziert; eine geeignete Technik zur routinemässigen Bestimmung der gruppenspezifischen Komponente (Gc-Faktor) nach HIRSCHFELD wird nach umfangreichen Vorversuchen entwickelt und ausführlich beschrieben. Verschiedene Antiseren gegen Plasmaproteinfraktionen vom Menschen werden auf ihre Spezifität hinsichtlich des Gc-Faktors untersucht.

Die eigenen Untersuchungen zur Genetik des Gc-Faktors wurden an insgesamt 1228 Blutseren durchgeführt. Das Untersuchungsgut gliedert sich in 208 Blutspender, 134 Familien mit 250 Kindern und 251 Mutter-Kind-Paare; alle Probanden sind aus Deutschland; sie stammen zum grösseren Teil (dem Wohnsitz nach) aus Oberbayern.

Die Familienuntersuchungen brachten eine Bestätigung der Hypothese von HIRSCHFELD, RASMUSON und JONSSON , wonach der Polymorphismus des Gc-Systems durch ein Allelenpaar (Gc^1, Gc^2) bedingt wird: der Phänotypus Gc 1-1 entspricht dem Genotypus Gc^1/Gc^1; der analoge homozygote Phänotypus Gc 2-2 entspricht dem Genotypus Gc^2/Gc^2, während der Phänotypus Gc 2-1 auf Heterozygotie der beiden Allelen Gc^1 und Gc^2 zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der Familienuntersuchungen und der Untersuchungen an den Mutter-Kind-Verbindungen stehen in vollem Einklang mit dieser Hypothese; Ausnahmen wurden nicht beobachtet.

Die unter populationsgenetischem Aspekt vorgenommene Auswertung des Untersuchungsgutes erbrachte eine Häufigkeit des Allels Gc^1 von 0,74 und des Allels Gc^2 von 0,26. Die Häufigkeiten der drei Phänotypen entsprechen in ihrer Proportion dem HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht (Abweichung von der Durchmischung im Rahmen der Zufallsgrenzen). Die beobachteten Genhäufigkeiten wurden verglichen mit den bisher bekannten Daten von anderen Populationen. Es ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit den europäischen Gruppen sowie den Stichproben aus USA, die Europäer-Abkömmlinge sind. Die wenigen bisher untersuchten Neger- und Indianerpopulationen haben eine grössere Häufigkeit des Allels Gc^1 (mehr als 0,90).

Die Arbeit wurde im Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Saller) durchgeführt. Für die Überlassung des Untersuchungsmaterials erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. Dr. K. SALLER, für die Anregung und weitere Hilfe bei der Arbeit den Herren Prof. Dr. Dr. H. BAITSCH, Priv. Doz. Dr. Dr. F. SCHWARZFISCHER und Priv. Doz. Dr. Dr. G. ZIEGELMAYER besonders zu danken; für wertvolle Ratschläge zur technischen Durchführung und Überlassung noch unveröffentlichten Materials bin ich auch Herrn Dr. J. HIRSCHFELD/ Stockholm zu grossem Dank verpflichtet.

LITERATURVERZEICHNIS

ALLISON, A.C.: Identification of human serum proteins binding iron, copper and thyroid hormones by starch-gel electrophoresis. Experientia 15 : 281 (1959).

BAITSCH, H. und JENSSEN, W.J.:
Zur Populationsgenetik des Gc-Systems: Allelenhäufigkeit in einer Stichprobe bayerischer Blutspender. Anthrop. Anz. 25 : 185 (1962).

BAITSCH, H. und STUMPF, W.:
Immunoelektrophoretischer Vergleich von Menschen- und Schimpansenserum. Anthrop. Anz. 23 : 72 (1959).

BAITSCH, H. und LIEBRICH, K.G.:
Die Haptoglobintypen. Blut 7 : 27 u. 69 (1961).

CLAUSEN, J.: Oversigt over immunelektroforesens teoretiske grundlag og praktiske anvendelse med saerligt henblik pa serumproteiner; med. Diss. (Köpenhamn 1960).

CLEVE, H. and BEARN, A.G.:
Inherited variations in human serum proteins: studies on the group-specific component. Ann. N. Y. Acad. Sci. 94 : 218 (1961).

GRABAR, P. et BURTIN, P.:
Analyse immuno-électrophorétique. Application aux liquides biologiques humains (Masson, Paris 1960).

GRABAR, P. et WILLIAMS, C.A.:
Méthode permettant l'étude conjugée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochim. biophys. Acta 10 : 193 (1953).

GRUBB, R.: Agglutination of erythrocytes coated with "imcomplete" anti-Rh by certain rheumatoid arthritic sera and some other sera. The existence of human serum groups. Acta path. microbiol. scand. 39 : 195 (1956).

GRUBB, R. and LAURELL, A.B.:
Hereditary serological human serum groups. Acta path. microbiol. scand. 39 : 390 (1956).

GYÖRGY, P. and WITEBSKY, E.:
Anaphylaxie durch Bildung von Serumisoantikörpern nach wiederholter Transfusion gegen gruppengleiches väterliches Blut. Münch. med. Wschr. 76 : 195 (1929).

HARRIS, H.: Inherited variations of human plasma proteins. Brit. med. Bull. 17 : 217 (1961).

HEREMANS, J.: Les globulines sériques du système gamma; med. Diss. (Bruxelles 1960).

HIRSCHFELD, J.: Individual precipitation patterns of normal rabbit sera. Acta path. microbiol. scand. 46 : 229 (1959).

HIRSCHFELD, J.: A simple method of determining haptoglobin groups in human sera by means of agar-gel electrophoresis. Acta path. microbiol. scand. 47 : 169 (1959).

HIRSCHFELD, J.: Group-specific differences in human sera demonstrated with immunoelectrophoresis. 12th Scand. Congr. Pathology and Microbiology, Gothenburg 1959. Acta. path. microbiol. scand. (Suppl. 144) 51 : 305 (1961).

HIRSCHFELD, J.: Immunoelectrophoresis-procedure and application to the study of group-specific variations in sera. Science Tools 7 : 18 (1960).

HIRSCHFELD, J.: Shape of the precipitate in immunoelectrophoresis. Nature 185 : 164 (1960).

HIRSCHFELD, J.: Agar-Gel electrophoretic demonstration of individual variations in electrophoretic position of an indoxyl-acetate splitting component in the α_2-globulin region of normal human sera. Nature 186 : 321 (1960).

HIRSCHFELD, J.: Variations in electrophoretic position of haptoglobin mixtures in agar-gel electrophoresis. Nature 186 : 894 (1960).

HIRSCHFELD, J., JONSSON, B., u. RASMUSON, M.:
Inheritance of a new group-specific system demonstrated by means of an immunoelectrophoretic technique. Nature 185 : 931 (1960).

HIRSCHFELD, J. and SÖDERBERG, U.:
Immuno-electrophoretic demonstration of precipitating components in sera from pregnant women. Nature 187 : 332 (1960).

HIRSCHFELD, J. and SÖDERBERG, U.:
Autoradiographs of human sera tagged with radioactive thyroxine and investigated in immunoelectrophoresis. Experientia 16 : 198 (1960).

HIRSCHFELD, J. and SÖDERBERG, U.:
The unsaturated binding capacity of the thyroxine-binding proteins in pregnant women and newborn infants. Acta obstet. gynec. scand. 39 : 645 (1960).

HORSFALL, W.R. and SMITHIES, O.:
Genetic control of some human serum ß-globulins. Science 128 : 35 (1958).

KALOW, W. and DAVIES, R.O.:
The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase. Biochem. Pharmacol. 1 : 183 (1958).

KALOW, W. and GENEST, K.:
A method for the detection of atypical forms of human cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. Canad. J. Biochem. 35 : 339 (1957).

KALOW, W. and GUNN, D.R.:
Some statistical data on atypical cholinesterase of human serum. Ann. hum. Genet. 23 : 239 (1959).

LAURELL, C.B., LAURELL, S. and SKOOG, N.:
Buffer composition in paper electrophoresis. Considerations on its influence, with special reference to the interaction between smal ions and proteins. Clin. Chem. 2 : 99 (1956).

MOLLISON, Th.: Arteiweiss und Erbsubstanz. Z. Morph. Anthrop. 34 : 261 (1934).

MOLLISON, Th.: Der Aufbau des Arteiweisses in Stammesgeschichte und Einzelentwicklung. Scientia Sér. 35 : 154 (1941).

MORELL, A.G. and SCHEINBERG, I.H.:
Heterogenity of human ceruloplasmin. Science 131 : 930 (1960).

OUCHTERLONY, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels. Arkiv Kemi Mineral. Geol. 26 B : 1 (1948).

OUCHTERLONY, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy 5 : 1 (1958).

SCHEIDEGGER, J.J.: Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. Int. Arch. Allergy 7 : 103 (1955).

SCHULTZE, H.E. und SCHWICK, G.:
Immunchemischer Nachweis von Proteinveränderungen unter besonderer Berücksichtigung fermentativer Einwirkungen auf Glyko- und Lipoproteine. Immunoelektrophoretische Studien. Behringwerk Mitteilungen 33 : 11 (1957).

SCHWICK, G.: Die Technik der Immunoelektrophorese. Laboratoriums-Blätter der Behringwerke 8 : 11 (1958).

SMITHIES, O.: Grouped variations in the occurrence of new protein components in normal human serum. Nature 175 : 307 (1955).

SMITHIES, O.: Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochem.J. 61 : 629 (1955).

SMITHIES, O. and HILLER, O.:
The genetic control of transferrins in humans. Biochem.J. 72 : 121 (1959).

SMITHIES, O. and WALKER, N.F.:
Genetic control of some serum proteins in normal humans. Nature 176 : 1265 (1955).

SMITHIES, O. and WALKER, N.F.:
Notation for serum protein groups and the genes controlling their inheritance. Nature 178 : 694 (1956).

UHLENHUTH, P. und WEIDANZ, O.:
Praktische Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweissdifferenzierungsverfahrens mit besonderer Berücksichtigung der forensischen Blut- und Fleischuntersuchung sowie der Gewinnung präzipitierender Sera. Fischer, Jena (1909).

UHLENHUTH, P.: Die Bedeutung des Tierexperiments für die Medizin, besonders für die Erforschung des Wesens, der Erkennung und Bekämpfung der Seuchen. Freiburger Universitätsreden 2 (1929).

URIEL, J.: Etude de l'activité enzymatique de la céruloplasmine du sérum humain après électrophorèse et immunoélectrophorèse en gélose. Bull.Soc.chim.biol. 34 : 105 (1957).

URIEL, J.: Les réactions de caractérisation des constituants des liquides biologiques après électrophorèse en gélose. Clin.chim.Acta 3 : 17 (1958).

WILLIAMS, C.A. and GRABAR, P.:
Immunoelectrophoretic studies on serum proteins. 1. The antigens of human serum. J. Immunol. 74 : 158 (1955).

LEBENSLAUF

Am 27. August 1924 wurde ich als erstes Kind des Baumeisters Karl Jenssen und seiner Ehefrau Emmi, geborene Lütjohann in Rehna/Mecklenburg geboren. Die Volksschule besuchte ich in Rehna von Ostern 1931 bis Ostern 1935, anschliessend die Claus-von-Pape Schule, Oberschule für Jungen, in Schwerin/Mecklenburg. Im Juli 1942 wurde ich in den RAD eingezogen und erhielt von der Schule den Reifevermerk. Im Juli 1943 kam ich zur Wehrmacht. 1945 geriet ich in russische Gefangenschaft, aus der ich im Januar 1956 nach Westdeutschland zurückkehrte.

Im Wintersemester 1956/57 begann ich das Studium der Naturwissenschaften an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, das ich mit dem Staatsexamen für das Lehramt an höheren Schulen nach dem Sommersemester 1960 abschloss. Seit Dezember 1960 bin ich Studienreferendar.

1957 heiratete ich und habe zwei Söhne.